Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

►B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

(Text s významem pro EHP)

(Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►M1	Nařízení Komise (ES) č. 761/2009 ze dne 23. července 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Nařízení Komise (EU) č. 1152/2010 ze dne 8. prosince 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Nařízení Komise (EU) č. 640/2012 ze dne 6. července 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Nařízení Komise (EU) č. 260/2014 ze dne 24. ledna 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Nařízení Komise (EU) č. 900/2014 ze dne 15. července 2014	L 247	1	21.8.2014

▼B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

(Text s významem pro EHP)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ([1]), a zejména na čl. 13 odst. 3 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Podle nařízení (ES) č. 1907/2006 se na úrovni Společenství stanoví zkušební metody pro účely provádění zkoušek látek, jsou-li tyto zkoušky vyžadovány pro získání informací o podstatných vlastnostech látek.

(2) Směrnice Rady 67/548/EHS ze dne 27. června 1967 o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek ([2]) stanovila v příloze V metody určení fyzikálně-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látek a přípravků. Příloha V směrnice 67/548/EHS byla zrušena směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2006/121/ES s účinností ode dne 1. června 2008.

(3) Zkušební metody obsažené v příloze V směrnice 67/548/EHS by měly být zahrnuty do tohoto nařízení.

(4) Tímto nařízením není vyloučeno použití jiných zkušebních metod, pokud je ovšem jejich použití v souladu s čl. 13 odst. 3 nařízení č. 1907/2006.

([1]) Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1; opravené znění v Úř. věst. L 136, 29.5.2007, s. 3.

([2]) Úř. věst. L 196, 16.8.1967, s. 1. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2006/121/ES (Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 850; opravené znění v Úř. věst. L 136, 29.5.2007, s. 281) – *nutno aktualizovat s příslušnými odkazy, jakmile bude zveřejněn dokument týkající se třicátého přizpůsobení technickému pokroku.*

▼B

(5) Při stanovení zkušebních metod je třeba vzít plně v úvahu zásadu nahrazovat, omezovat a zdokonalovat používání zvířat při provádění zkoušek, zejména pokud existují vhodné validované metody, které nahrazení, omezení nebo zdokonalení zkoušek prováděných na zvířatech umožňují.

(6) Ustanovení tohoto nařízení jsou v souladu se stanoviskem výboru zřízeného podle článku 133 nařízení (ES) č. 1907/2006,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Zkušební metody k použití pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006 jsou stanoveny v příloze tohoto nařízení.

Článek 2

Komise podle potřeby přezkoumá zkušební metody uvedené v tomto nařízení s cílem nahradit, omezit nebo zdokonalit zkoušky na obratlovcích.

Článek 3

Všechny odkazy na přílohu V směrnice 67/548/EHS se považují za odkazy na toto nařízení.

Článek 4

Toto nařízení vstupuje v platnost prvním dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne 1. června 2008.

▼B

PŘÍLOHA

ČÁST A: METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

OBSAH

A.1	BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ
A.2	BOD VARU
A.3	RELATIVNÍ HUSTOTA
A.4	TLAK PAR
A.5	POVRCHOVÉ NAPĚTÍ
A.6	ROZPUSTNOST VE VODĚ
A.8	ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT
A.9	BOD VZPLANUTÍ
A.10	HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)
A.11	HOŘLAVOST PLYNŮ
A.12	HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)
A.13	PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN
A.14	VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI
A.15	BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)
A.16	RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK
A.17	OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)
A.18	POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ
A.19	OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH
A.20	CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO EXTRAKCI VE VODĚ
A.21	OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)
A.22	DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN

▼M4

A.23.	ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (OKTAN-1-OL/VODA): METODA POMALÉHO MÍCHÁNÍ

▼B

A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ

1. METODA

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a přístroje jsou určeny ke stanovení bodu tání látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Výběr metody závisí na povaze látky, která má být zkoumána. Omezením bude tedy skutečnost, zda lze danou látku rozmělnit na prášek snadno, obtížně nebo zda ji nelze rozmělnit.

U některých látek je vhodnější stanovení bodu tuhnutí nebo krystalizace a normalizované metody pro tato stanovení jsou v této metodě rovněž uvedeny.

Nelze-li vzhledem ke zvláštním vlastnostem látky dobře stanovit žádný z uvedených parametrů, může byt vhodné stanovit bod tekutosti.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod tání je definován jako teplota, při níž dochází za atmosférického tlaku k přechodu z pevného do kapalného skupenství a která za ideálních podmínek odpovídá bodu tuhnutí.

Vzhledem k tomu, že u mnoha látek dochází k fázovému přechodu v rozmezí teplot, je toto rozmezí často nazýváno rozmezím bodu tání.

Přepočet jednotek (K na ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsiova teplota, stupně Celsia (^{o}C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při zkoumání nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v literatuře (4).

▼B

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Stanovuje se teplota (teplotní rozmezí) fázového přechodu z pevného do kapalného skupenství nebo z kapalného do pevného skupenství. V praxi se při zahřívání/ochlazování vzorku zkoušené látky za atmosférického tlaku stanoví teploty počátku tání/tuhnutí a konce tání/-tuhnutí. Je popsáno pět typů metod, jmenovitě kapilární metoda, metody používající zahřívací bloky, metody stanovení bodu tuhnutí, metody termické analýzy a stanovení bodu tekutosti (vyvinuto pro minerální oleje).

V některých případech může být vhodné měřit bod tuhnutí místo bodu tání.

1.4.1 **Kapilární metoda**

1.4.1.1 *Zařízení pro stanovení bodu taní s kapalinovou lázní*

Malé množství jemně rozmělněné látky se vpraví do kapiláry a zhutní se. Kapilára se zahřívá spolu s teploměrem, přičemž se rychlost nárůstu teploty během tání nastaví na méně než 1 K/min. Stanoví se teploty počátku a konce tání.

1.4.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Provádí se podobně jako v bodě 1.4.1.1 s tím rozdílem, že kapilára a teploměr jsou umístěny v kovovém vyhřívaném bloku a pozorují se otvory v bloku.

1.4.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Vzorek v kapiláře se automaticky zahřívá v kovovém válci. Otvorem ve válci prochází látkou světelný paprsek na přesně kalibrovaný fotočlánek. Při tání mění většina látek optické vlastnosti a z neprůhledných se mění na průhledné. V tomto okamžiku vzroste intenzita světla dopadajícího na fotočlánek a do zařízení odečítajícího teplotu platinového odporového teploměru umístěného v topné komůrce je vyslán signál k zastavení zaznamenávání. Tato metoda není vhodná pro některé silně zbarvené látky.

1.4.2 **Zahřívací bloky**

1.4.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Koflerův zahřívací stolek je tvořen dvěma kovovými částmi s různou teplotní vodivostí, je vyhříván elektricky a je konstruován tak, že teplotní gradient je po jeho délce téměř lineární. Teplota stolku se může měnit od 283 do 573 K; stolek je vybaven speciálním zařízením pro odečítání teploty, tvořeným jezdcem s ukazatelem a stupnici navrženou pro daný stolek. Pro stanovení bodu tání se látka nanese v tenké vrstvě přímo na povrch stolku. Během několika sekund se vytvoří ostrá dělicí linie mezi kapalnou a pevnou fází. Teplota v místě dělicí linie se odečte po nastavení ukazatele na tuto dělicí linii.

▼B

1.4.2.2 *Tavící mikroskop*

Pro stanovení bodu tání velmi malých množství látek se používají různé typy mikroskopů s ohřívacím stolkem. Většina ohřívacích stolků využívá k měření teploty citlivé termočlánky, používají se však i rtuťové teploměry. Typický přístroj pro stanovení bodu tání pomocí mikroskopu s ohřívacím stolkem má ohřívací komoru s kovovou deskou, na kterou se umístí vzorek na podložním sklíčku. Ve středu kovové desky je otvor, kterým může procházet světelný paprsek odražený osvětlovacím zrcátkem mikroskopu. Při měřeních se ohřívací komora přikryje skleněnou destičkou, aby se omezila cirkulace vzduchu v místě, kde se nachází vzorek.

Ohřev vzorku se kontroluje regulačním odporem. Pro velmi přesná měření opticky anisotropních látek lze používat polarizované světlo.

1.4.2.3 *Menisková metoda*

Tato metoda se používá především pro polyamidy.

Vizuálně se stanoví teplota, při které se zřetelně posune meniskus silikonového oleje uzavřeného mezi ohřívacím blokem a skleněnou krycí destičkou umístěnou na vzorku zkoušeného polyamidu.

1.4.3 **Metoda stanovení bodu tuhnutí**

Vzorek se vloží do speciální zkumavky, která se umístí do přístroje pro stanovení bodu tuhnutí. Během ochlazování se vzorek nepřetržitě pomalu míchá a ve vhodných intervalech se odečítá teplota. Jakmile je teplota po několik odečtů konstantní (po odpovídající korekci teploměru), je zaznamenána jako bod tuhnutí.

Podchlazení je nutno zabránit udržováním rovnováhy mezi pevnou a kapalnou fází.

1.4.4 **Termická analýza**

1.4.4.1 *Diferenční termická analýza (DTA)*

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem, jež jsou podrobeny stejnému řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu teploty.

▼B

1.4.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)*

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu tepelného toku.

1.4.5 **Bod tekutosti**

Metoda byla vyvinuta pro minerální oleje a je vhodná pro měření olejovitých látek s nízkým bodem tání.

Po počátečním zahřátí se vzorek určitou rychlostí ochlazuje a v intervalech po 3 K se stanovuje jeho tekutost. Nejnižší teplota, při níž je ještě pozorován pohyb látky, se zaznamená jako bod tekutosti.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod stanovení bodu tání/rozmezí bodu tání jsou uvedeny v této tabulce.

TABULKA: POUŽITELNOST METOD

A. **Kapilární metody**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost ([1])	Existující norma
Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní	ano	pouze pro několik látek	273 až 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem	ano	pouze pro několik látek	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekce fotočlánkem	ano	pro některé látky s použitím přídavných zařízení	253 až 573 K	± 0,5 K	

([1]) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

▼B

B. **Zahřívací bloky a stanovení bodu tuhnutí**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Koflerův zahřívací stolek	ano	ne	283 až > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Tavicí mikroskop	ano	pouze pro několik látek	273 až > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskova metoda	ne	především pro polyamidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Metoda stanovení bodu tuhnutí	ano	ano	223 až 573 K	± 0,5 K	např. BS 4695

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

C. **Termická analýza**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Diferenční termická analýza	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

D. **Bod tekutosti**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Teplota tekutosti	pro minerální oleje a olejové látky	pro minerální oleje a olejové látky	223 až 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

1.6 POPIS METOD

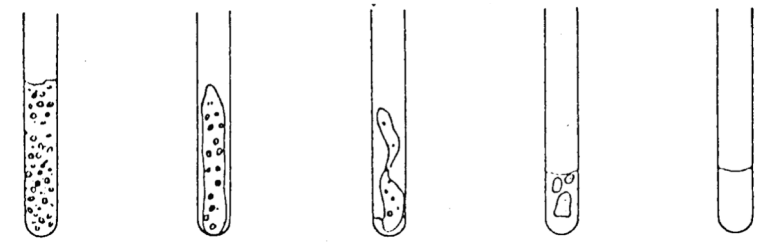
Postupy téměř všech těchto zkušebních metod jsou popsány v národních a mezinárodních normách (viz doplněk 1).

1.6.1 **Kapilární metody**

Při pomalém vzestupu teploty lze u jemně práškovitých látek obvykle rozlišit stupně tání znázorněné na obrázku 1.

▼B

Obrázek 1



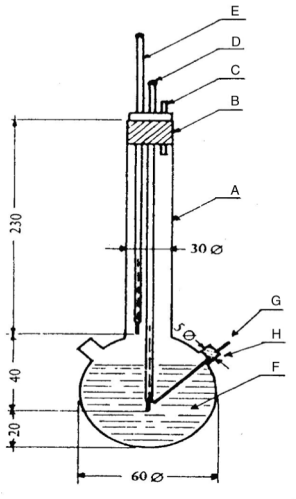
Fáze A	(Počátek tání): na vnitřní straně trubičky se stejnoměrně drží jemné kapičky.
Fáze B	V důsledku smrštění vzorku se mezi vnitřní stěnou a vzorkem tvoří mezera.
Fáze C	Smrštěný vzorek se začíná hroutit dolů a stává se tekutým.
Fáze D	Na povrchu se tvoří úplný meniskus, ale značná část vzorku je dosud pevná.
Fáze E	(Konečná fáze tání): Vzorek již neobsahuje žádné pevné částice.

Během stanovení bodu tání se zaznamenávají teploty počátku tání a konečné fáze.

1.6.1.1. *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Na obrázku 2 je znázorněna normalizovaná skleněná aparatura pro stanovení bodu tání (JIS K 0064); všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech.

Obrázek 2



A. Měřicí baňka
B. Zátka
C. Trubice pro vyrovnání tlaku
D. Teploměr
E. Pomocný teploměr
F. Kapalinová lázeň
G. Skleněná kapilára, délka 80-100 mm, vnitřní průměr 1,0 mm ± 0,2 mm, síla stěny 0,2 až 0,3 mm
H. Boční hrdlo

▼B

Kapalinová lázeň:

Je třeba zvolit vhodnou kapalinu. Volba kapaliny závisí na bodu tání, který má být stanoven, např. kapalný parafin pro stanovení bodu tání nižšího než 473 K, silikonový olej pro stanovení bodu tání nižšího než 573 K.

Pro stanovení bodu tání vyššího než 523 K lze použít směs tří hmotnostních dílů kyseliny sírové a dvou hmotnostních dílů síranu draselného. S tímto typem směsi je třeba pracovat s náležitou opatrností.

Teploměr:

Měly by se používat pouze teploměry, které splňují požadavky norem ASTM E 171, DIN 12770, JIS K 8001 nebo rovnocenných norem.

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Postup:

Suchá látka se jemně rozetře v třecí misce a vpraví se do kapiláry zatavené na jednom konci, a to tak, aby po zhutnění byla kapilára naplněna do výšky přibližně 3 mm. Má-li se dosáhnout stejnoměrného zhutnění, nechá se kapilára dopadnout z výšky přibližně 700 mm skleněnou trubicí na hodinové sklíčko.

Naplněná kapilára se vloží do lázně tak, aby se střední část rtuťové baňky teploměru dotýkala kapiláry v místě, kde se nachází vzorek. Kapilára se obvykle vkládá do lázně při teplotě asi o 10 K nižší, než je bod tání.

Lázeň se zahřívá tak, aby vzestup teploty činil přibližně 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K pod očekávaným bodem tání se růst teploty upraví na nejvýše 1 K/min.

Výpočet:

Bod tání se vypočte takto:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)n$

kde:

T = korigovaný bod tání v K

T_D = odečet teploty na teploměru D v K

T_E = odečet teploty na teploměru E v K

n = počet stupňů, o něž rtuťový sloupec teploměru D vyčnívá z kapaliny.

1.6.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Přístroj:

Je tvořen:

— válcovým kovovým blokem, jehož horní část je dutá a tvoří komoru (viz obrázek 3),

— kovovou krycí deskou se dvěma nebo více otvory, kterými je možno do kovového bloku zavést trubičky,

▼B

— ohřívacím systémem kovového bloku, například elektrickým topným odporem uzavřeným v kovovém bloku,

— regulačním odporem pro regulaci příkonu, je-li použit elektrický ohřev,

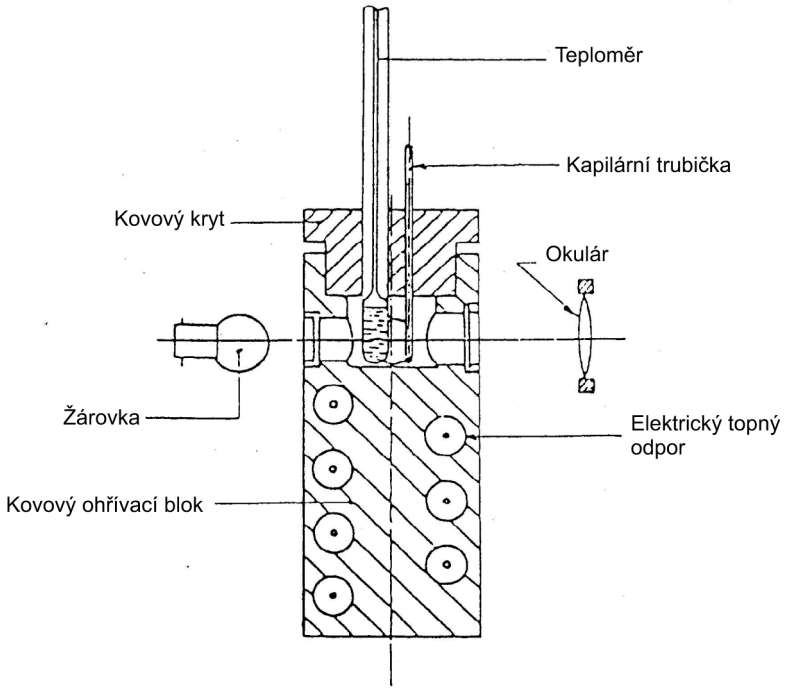
— čtyřmi okénky ze žáruvzdorného skla v bočních stěnách ohřívací komory, orientovanými vůči sobě pod pravým úhlem. Před jedním z těchto okének je umístěn okulár pro pozorování kapilární trubičky. Ostatní tři okénka slouží k osvětlení vnitřního prostoru žárovkami,

— kapilární trubičkou z žáruvzdorného skla zatavenou na jednom konci (viz 1.6.1.1).

Teploměr:

Viz normy uvedené v 1.6.1.1. Je rovněž možné použít termoelektrické měřicí přístroje srovnatelné přesnosti.

Obrázek 3



1.6.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Přístroj a postup:

Přístroj se skládá z kovové komory s automatickým ohřívacím zařízením. Tři kapilární trubičky se naplní podle bodu 1.6.1.1 a umístí se do ohřívací komory.

▼B

Pro kalibraci přístroje je k dispozici několik lineárních režimů růstu teploty, přičemž vhodný lineární růst teploty se elektricky nastaví předem zvolenou konstantou. Zaznamenávací zařízení ukazují teplotu v ohřívací komoře a teplotu látky v kapilárách.

1.6.2 **Zahřívací bloky**

1.6.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Viz doplněk.

1.6.2.2 *Tavící mikroskop*

Viz doplněk.

1.6.2.3 *Menisková metoda (pro polyamidy*

Viz doplněk.

V oblasti bodu tání by měla být rychlost ohřevu menší než 1 K/min.

1.6.3 **Metody stanovení bodu tuhnutí**

Viz doplněk.

1.6.4 **Termická analýza**

1.6.4.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

1.6.5 **Stanovení bodu tekutosti**

Viz doplněk.

2. **DATA**

V některých případech je nutno provést korekci teploměru.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod tání se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulky).

▼B

Leží-li rozdíl teplot počáteční a konečné fáze tání v mezích přesnosti metody, uvede se jako bod tání konečná teplota, v opačném případě se uvedou obě teploty.

Jestliže se látka před dosažením bodu tání rozkládá nebo sublimuje, uvede se teplota, při které dochází k pozorovanému jevu.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803–834.

3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505–515.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Kapilární metody**

1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2 Přístroje pro stanovení bodu tání s kovovým blokem

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunst-stoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

2. **Zahřívací bloky**

2.1 Koflerův zahřívací stolek

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2 Tavicí mikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunst-stoffen

2.3 Menisková metoda (pro polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du „point de fusion“ methode du menisque

3. **Metody stanovení bodu tuhnutí**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termická analýza**

4.1 Diferenční termická analýza

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Stanovení bodu tekutosti**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B

A.2 BOD VARU

1. METODA

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a zařízení lze použít pro kapaliny a látky s nízkým bodem tání, pokud nepodléhají chemickým reakcím pod bodem varu (např. autooxidaci, přesmyku, rozkladu atd.). Metody lze použít jak pro čisté kapalné látky, tak pro kapalné látky obsahující nečistoty.

Přednost mají metody využívající detekci fotočlánkem a metody termické analýzy, protože umožňují stanovení jak bodu tání, tak bodu varu. Tato měření mohou být navíc prováděna automaticky.

„Dynamická metoda“ má tu výhodu, že ji lze použít i ke stanovení tlaku par a přitom není třeba korigovat bod varu na normální tlak (101,325 kPa), neboť tento tlak lze během měření nastavit manostatem.

Poznámky:

Vliv nečistot na stanovení bodu varu závisí ve velké míře na jejich povaze. Jestliže vzorek obsahuje těkavé nečistoty, které mohou ovlivnit výsledky, může být látky přečištěna.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Standardní bod varu je definován jako teplota, při které je tlak par dané kapaliny roven 101,325 kPa.

Jestliže se měření bodu varu neprovádí za normálního tlaku, lze závislost tlaku par na teplotě popsat Clausiovou-Clapeyronovou rovnicí:

$$\log P = \frac{\Delta H_v}{2,3\ RT} + konst.$$

kde:

P = tlak par látky v Pa,

ΔH_V = výparné teplo v $Jmol^{-1}$

R = univerzální molární plynová konstanta = 8,314 $Jmol^{-1}\ K^{-1}$

T = termodynamická teplota v K

Bod varu se uvádí s ohledem na okolní tlak při měření.

▼B

Přepočty

Tlak (jednotka: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 Mpa

(jednotka „bar“ je nadále přípustná, její používání se však nedoporučuje)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 torr

(jednotky „mm Hg“ a „torr“ nejsou povoleny)

1 atm = standardní atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ není povolena).

Teplota (jednotka:K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsiova teplota, stupeň Celsia (^{o}C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v doplňku.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pět metod stanovení bodu varu (teplotního rozmezí bodu varu) je založeno přímo na měření teploty varu, další dvě využívají termální analýzy.

1.4.1 **Stanovení ebuliometrem**

Ebuliometry byly původně vyvinuty pro stanovení molekulové hmotnosti na základě zvýšení teploty varu, jsou však vhodné také pro přesná měření bodu varu. Velmi jednoduchý přístroj je popsán v normě ASTM D 112072 (viz doplněk). V tomto přístroji se kapalina zahřívá za rovnovážných podmínek při atmosférickém tlaku, dokud nezačne vřít.

1.4.2 **Dynamická metoda**

Metoda zahrnuje měření teploty kondenzace páry vhodným teploměrem umístěným za varu ve zpětném toku (refluxu). U této metody lze měnit tlak.

1.4.3 **Destilační metoda pro stanovení bodu varu**

Metoda zahrnuje destilaci kapaliny a měření teploty kondenzace páry, přičemž se stanovuje také množství destilátu.

▼B

1.4.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce, která je ponořena do tepelné lázně. Do zkumavky se vzorkem je zasunuta zatavená kapilára, v jejíž spodní části se nachází vzduchová bublinka.

1.4.5 **Detekce fotočlánkem**

Při použití principu unikajících bublinek podle Siwoloboffa se provádí automatické fotoelektrické měření.

1.4.6 **Diferenční termická analýza**

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty, přičemž látka a referenční materiál se podrobí témuž řízenému teplotnímu programu. Jestliže u studované látky dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu teploty.

1.4.7 **Diferenční skenovací kalorimetrie**

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu tepelného toku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod používaných pro stanovení bodu/teplotního rozmezí bodu varu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Srovnání metod

Metoda měření	Odhadnutá přesnost	Existující norma
Stanovení ebuliometrem	± 1,4 K (do 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamická metoda	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podle Siwoloboffa	±2 K (do 600 K) (2)	
Detekce fotočlánkem	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Diferenční termická analýza	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Tato přesnost platí pouze pro jednoduchý přístroj, popsaný např. v normě ASTM D 1120-72; může být zlepšena užitím dokonalejšího ebuliometru.
(2) Platí pouze pro čisté látky. Užití za jiných okolností by mělo být zdůvodněno.

▼B

1.6 POPIS METOD

Postupy některých zkušebních metod jsou popsány v mezinárodních a národních normách (viz doplněk).

1.6.1 **Ebuliometr**

Viz doplněk.

1.6.2 **Dynamická metoda**

Viz metoda A.4 pro stanovení tlaku par.

Zaznamená se teplota varu naměřená při tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 **Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)**

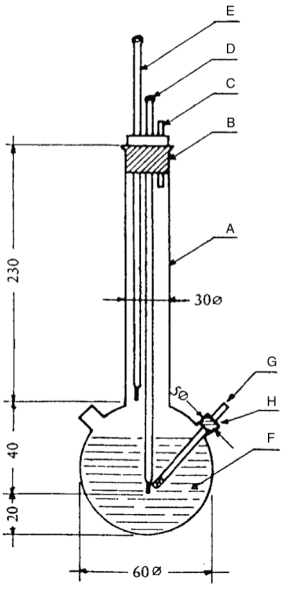
Viz doplněk.

1.6.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce o průměru přibližně 5 mm v přístroji pro stanovení bodu tání (obrázek 1).

Na obrázku 1 je znázorněn normalizovaný přístroj pro stanovení bodu varu (JIS K 0064) (přístroj je skleněný, všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech).

Obrázek 1



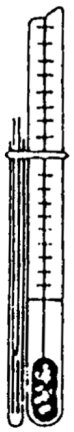
A. Měřící baňka
B. Zátka
C. Trubice pro vyrovnání tlaku
D. Teploměr
E. Pomocný teploměr
F. Kapalinová lázeň
G. Skleněná kapilára, délka 80–100 mm, vnitřní průměr 1,0 mm ± 0,2 mm, síla stěny 0,2 až 0,3 mm
H. Boční hrdlo

Do zkumavky se vloží kapilára (varná kapilára) zatavená asi 1 cm nad spodním koncem. Zatavená část kapiláry musí ležet pod hladinou kapaliny. Zkumavka obsahující kapiláru se upevní buď pryžovou páskou k teploměru, nebo pomocí bočního držáku (viz obrázek 2).

▼B

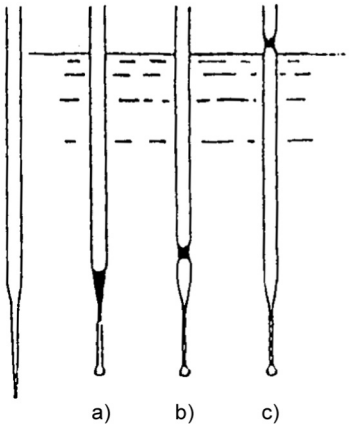
Obrázek 2

Princíp podle Siwoloboffa



Obrázek 3

Modifikovaný princíp



Kapalina pro lázeň se volí podle bodu varu. Pro teploty do 573 K lze použít silikonový olej. Parafinový olej lze použít pouze do 473 K. Kapalina v lázni se zahřívá tak, aby vzestup teploty byl zpočátku asi 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K před očekávaným bodem tání se zahřívání sníží tak, aby nárůst teploty byl nejvýše 1 K/min. Krátce před dosažením bodu varu začnou z varné kapiláry rychle unikat bublinky.

Bodu varu je dosaženo, když při ochlazování náhle ustane unikáni bublinek a kapalina začne v kapiláře stoupat. Příslušný údaj na teploměru je bodem varu látky.

Modifikovanou metodou (obrázek 3) se bod varu stanovuje v kapiláře pro stanovení bodu tání. Ta se vytáhne do tenké špičky dlouhé asi 2 cm (a) a do ni se nasaje malé množství vzorku. Otevřený konec tenké části kapiláry se zataví tak, aby na konci byla malá vzduchová bublinka. Při zahřívání v aparatuře pro stanoveni bodu táni (b) se vzduchová bublinka rozpíná. Bod varu odpovídá teplotě, při které sloupeček látky dosáhne hladiny kapalinové lázně (c).

1.6.5 **Detekce fotočlánkem**

Vzorek se zahřívá v kapiláře ve vyhřívaném kovovém bloku.

Otvory v bloku se vede světelný paprsek tak, aby procházel látkou na přesně kalibrovaný fotočlánek.

Při zvyšování teploty vzorku stoupají z kapiláry jednotlivé vzduchové bublinky. Při dosažení bodu varu počet bublinek značně vzroste. To vede ke změně intenzity světla zaznamenané fotočlánkem a vyvolá signál v měřicím přístroji, kterým se zastaví zaznamenávání teploty měřené platinovým odporovým teploměrem umístěným v bloku.

Tato metoda je zvláště vhodná, protože umožňuje stanovení teplot nižších než laboratorní teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez jakékoli úpravy přístroje. Pouze je třeba umístit přístroj v chladicí lázni.

▼B

1.6.6 **Termická analýza**

1.6.6.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.6.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

2. **DATA**

Při malých odchylkách od normálního tlaku (nejvýše ± 5 kPa) se hodnoty teploty varu přepočítávají na normalizovanou teplotu T_n pomocí Sidneyovy-Youngovy rovnice:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

kde:

Δp = (101,325 – p) [pozor na znaménko]

P = naměřený tlak v kPa

f_T = velikost změny teploty varu v závislosti na změně tlaku v K/kPa

T = naměřená teploty varu v K

T_n = teplota varu korigovaná na normální tlak v K

Teplotní korekční faktory f_T a rovnice pro jejich aproximaci jsou uvedeny pro řadu látek ve zmíněných mezinárodních a národních normách.

Například metoda podle DIN 53171 uvádí přibližné korekce pro rozpouštědla obsažená v nátěrových hmotách:

Tabulka 2

Teplotní korekční faktory f_T

Teplota T (K)	Korekční faktor f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod varu se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulka 1).

Uvedou se naměřené teploty varu a jejich střední hodnota a dále hodnota tlaku v kPa, při kterém byla měření provedena. Tlak by se měl pokud možno blížit normálnímu tlaku.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

3) R. Weissberger (ed.): Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Ebuliometr**

1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destilační postupy (teplotní rozmezí bodu varu)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenční termická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA

1. METODA

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody stanovení relativní hustoty jsou použitelné pro pevné a kapalné látky bez jakýchkoli omezení, pokud jde o jejich čistotu. Jednotlivé metody, které lze použít, jsou uvedeny v tabulce 1.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Relativní hustota D^{20}_4 pevných látek nebo kapalin je poměr mezi hmotností určitého objemu zkoumané látky stanovenou při 20 °C a hmotností stejného objemu vody stanovenou při 4 °C. Relativní hustota nemá rozměr.

Hustota látky P je podíl hmotnosti látky m a jejího objemu V.

Jednotkou hustoty P, v soustavě SI je kg/m^3.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY (1, 3)

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METOD

Používají se čtyři skupiny metod.

1.4.1 **Vztlakové metody**

1.4.1.1 *Hustoměry* (pro kapaliny)

Dostatečně přesné a rychlé stanovení hustoty lze provést plovoucími hustoměry, které umožní stanovit hustotu kapaliny odečtením hloubky jejich ponoření na kalibrované stupnici.

1.4.1.2 *Hydrostatické váhy* (pro kapaliny a pevné látky)

Ke stanovení hustoty zkoušeného vzorku lze využít rozdíl mezi jeho hmotností stanovenou na vzduchu a ve vhodné kapalině (např. vodě).

U pevných látek je naměřená hustota reprezentativní jen pro daný použitý vzorek. Při stanovení hustoty kapalin se zváží těleso známého objemu nejdříve na vzduchu a poté v kapalině.

1.4.1.3. *Metoda ponořené kuličky* (pro kapaliny) (4)

Touto metodou se stanoví hustota kapaliny z rozdílu mezi výsledky vážení kapaliny před ponořením kuličky známého objemu do zkoušené kapaliny a po něm.

▼B

1.4.2 **Pyknometrické metody**

Pro pevné látky a kapaliny lze použít pyknometry různých tvarů o známém objemu. Hustota se vypočte z rozdílu výsledků vážení plného a prázdného pyknometru a z jeho známého objemu.

1.4.3. **Vzduchový srovnávací pyknometr** (pro pevné látky)

Hustotu pevné látky v libovolné formě je možné měřit při pokojové teplotě plynovým srovnávacím pyknometrem. Objem látky se měří ve vzduchu nebo v inertním plynu v kalibrovaném válci nastavitelného objemu. Pro výpočet hustoty se po skončení měření objemu provede vážení.

1.4.4 **Oscilační densimetr** (5, 6, 7)

Hustotu kapaliny lze měřit oscilačním densimetrem. Mechanický oscilátor konstruovaný ve tvaru U trubice se rozkmitá na rezonanční kmitočet, který závisí na jeho hmotnosti. Po vložení vzorku se rezonanční kmitočet oscilátoru změní. Aparaturu je nutné kalibrovat dvěma kapalinami o známé hustotě. Kapaliny by měly být voleny nejlépe tak, aby pokrývaly rozmezí, ve kterém leží hustota měřeného vzorku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost různých metod pro stanovení relativní hustoty je uvedena v tabulce.

1.6 POPIS METOD

Normy uvedené jako příklady, ve kterých je možno vyhledat technické podrobnosti, jsou uvedeny v doplňku.

Zkoušky musí být provedeny při 20 °C a provedou se nejméně dvě měření.

2. **DATA**

Viz normy.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění.

Relativní hustota D_4^{20} se uvede podle definice v bodě 1.2 společně se skupenstvím měřené látky.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

▼B

Tabulka

Použitelnost metod

	Hustota		Nejvyšší možná hodnota	
	pevné látky	kapaliny		
1.4.1.1 Hustoměr		ano	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostatické váhy				
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (A)
b) kapaliny		ano	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3 Metoda ponořené kuličky		ano	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometr				ISO 3507
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (B) NF T 20053
b) kapaliny		ano	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Vzduchový srovnávací pyknometr	ano			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4 Oscilační densimetr		ano	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 427–430.

5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.

6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.

7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Vztlakové metody**

1.1 Hustoměr

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostatické váhy

Pro pevné látky

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pro kapaliny

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3 Metoda ponořené kuličky

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Pyknometrické metody**

2.1 Pro kapaliny

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2 Pro pevné látky

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Vzduchové srovnávací pyknometry**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4 TLAK PAR

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 104 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato přepracovaná verze metody A.4 (1) zahrnuje jednu doplňkovou metodu, a to metodu efusní: isotermální termogravimetrii určenou pro látky s velmi nízkými tlaky (až 10^{-10} Pa). Vzhledem k tomu, že je zapotřebí postupů, zejména v souvislosti se stanovením tlaku par u látek s nízkou tenzí par, další postupy se přehodnocující v rámci této metody s ohledem na další rozmezí použitelnosti.

Při termodynamické rovnováze je tlak par čisté látky pouze funkcí teploty. Základní principy jsou popsány v literatuře (2, 3).

Neexistuje žádný postup vhodný pro celý rozsah tlaku par od méně než 10^{-10} do 10^5 Pa. Do této metody spadá osm metod měření tlaku par, které lze používat v různých rozmezích tlaku par. Jednotlivé metody jsou srovnány z hlediska použití a rozsahu měření v tabulce 1. Tyto metody lze použít pouze u sloučenin, které se za podmínek zkoušky nerozkládají. V případě, kdy nelze experimentální metody z technických důvodů použít, lze tlak par rovněž odhadnout, přičemž doporučená metoda odhadu je uvedena v dodatku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Tlak par látky je definován jako tlak nasycené páry nad pevnou nebo kapalnou látkou.

Měla by být používána jednotka tlaku v soustavě SI, tj. pascal (Pa). Dále jsou uvedeny některé dříve používané jednotky s odpovídajícími přepočítávacími faktory:

1 torr	= 1 mm Hg	= $1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 fyzikální atmosféra (atm)	= $1{,}013 \times 10^5$ Pa	
1 bar	= 10^5 Pa	

Jednotkou termodynamické teploty v soustavě SI je kelvin (K). Převod stupňů Celsia na kelviny se provádí podle vzorce:

$$T = t + 273{,}15$$

kde T je teplota v kelvinech, neboli termodynamická teplota, a t je teplota ve stupních Celsia.

▼**M1**

Tabulka 1

Metoda měření	Látky		Odhad opakovatelnosti	Odhad reprodukovatelnosti	Doporučená oblast
	pevné	kapalné			
Dynamická metoda	s nízkým bodem tání	ano	do 25 % 1 až 5 %	do 25 % 1 až 5 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa až 10^5 Pa
Statická metoda	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa 10^{-2} Pa až 10^5 Pa (1)
Metoda za použití isoteniskopu	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10^2 Pa až 10^5 Pa
Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par	ano	ano	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} Pa až 1 Pa
Efusní metoda: Knudsenova komůrka	ano	ano	10 až 30 %	—	10^{-10} Pa až 1 Pa
Efusní metoda: isotermální termogravimetrie	ano	ano	5 až 30 %	do 50 %	10^{-10} Pa až 1 Pa
Metoda sycení plynu	ano	ano	10 až 30 %	do 50 %	10^{-10} Pa až 10^3 Pa
Metoda rotujícího tělíska	ano	ano	10 až 20 %	—	10^{-4} Pa až 0,5 Pa

(1) Při použití kapacitního manometru.

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Obecně se tlak par stanovuje při různých teplotách. V omezeném rozsahu teplot je logaritmus tlaku par čisté látky nepřímo úměrný termodynamické teplotě podle zjednodušené Clapeyronovy-Clausiovy rovnice:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + konst$$

kde:

p = tlak par v pascalech,

ΔHv = výparné teplo v J mol^{-1},

R = univerzální molární plynová konstanta (8,314 J mol^{-1} K^{-1}),

T = termodynamická teplota v K.

▼**M1**

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky není nutné vždy používat. Slouží v první řadě k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

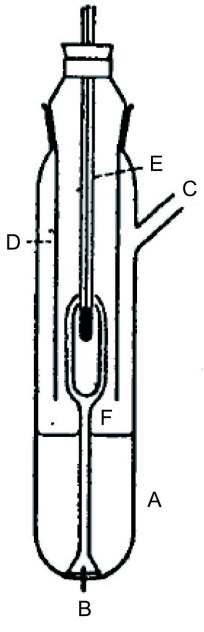
1.5 POPIS METODY

1.5.1 **Dynamická metoda (Cottrellova metoda)**

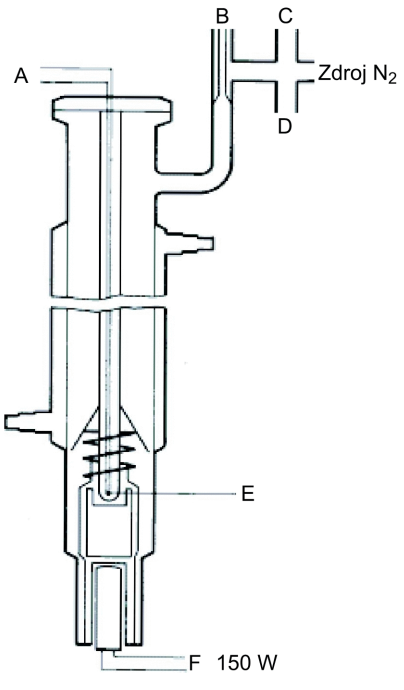
1.5.1.1 *Podstata*

Pro stanovení tlaku par látky se měří její teplota varu při různých specifikovaných tlacích mezi asi 10^3 a 10^5 Pa. Tato metoda se rovněž doporučuje pro stanovení bodu varu. K tomuto účelu je metoda vhodná až do teploty 600 K. Teploty varu kapalin jsou v hloubce 3 až 4 cm přibližně o 0,1 °C vyšší než na povrchu, a to kvůli hydrostatickému tlaku sloupce kapaliny. Při Cottrellově metodě (4) je teploměr umístěn do páry nad povrch kapaliny a vroucí kapalina se nepřetržitě čerpá okolo baňky teploměru. Baňku teploměru pokrývá tenká vrstva kapaliny, která je v rovnováze s párou při atmosférickém tlaku. Teploměr tak odečítá skutečnou teplotu varu bez chyb způsobených přehřátím nebo hydrostatickým tlakem. Vývěva původně používaná Cottrellem je zachycena na obrázku 1. Vroucí kapalina se nachází ve zkumavce A. Platinový drátek B zatavený do dna usnadňuje jednotný průběh vření. Boční trubička C vede do kondenzátoru a pouzdro D brání styku studeného kondenzátu a teploměru E. Když kapalina v A vře, bubliny a kapalina zachycená nálevkou se přelévá přes baňku teploměru prostřednictvím dvou ramen vývěvy F.

Obrázek 1



Obrázek 2



▼**M1**

Cottrellova vývěva (4)

A: Termočlánek

B: Vyrovnávací prostor vakua

C: Manometr

D: Vakuum

E: Měřicí bod

F: Topný článek asi 150 W

1.5.1.2 *Aparatura*

Velmi přesná aparatura využívající Cottrellův princip je zachycena na obrázku 2. Sestává se z trubice s varnou částí ve spodní části, chladiče ve střední části a výpusti a příruby v horní části. Cottrellova vývěva je umístěna ve varné části, která je ohřívána elektrickou topnou vložkou. Teplota se měří plášťovým termočlánkem nebo odporovým teploměrem zasunutým přes přírubu v horní části. Výpusť je připojena na systém regulace tlaku. Systém pro regulaci tlaku se skládá z vývěvy, vyrovnávacího objemu vakua, manostatu pro připouštění dusíku k ovládaní tlaku a manometru.

1.5.1.3 *Postup měření*

Látka se umístí do varné části. Při plnění pevných látek, které nejsou ve formě prášku, může dojít k problémům, kterým se však lze někdy vyhnout zahřátím chladicího pláště. Aparatura se uzavře přírubou a látka se odplyní. Touto metodou nelze měřit látky, které pění.

Poté se nastaví nejnižší požadovaný tlak a zapne se ohřev. Současně se teplotní čidlo připojí k zapisovači.

Rovnováhy je dosaženo, je-li při konstantním tlaku zaznamenána konstantní teplota varu. Je třeba věnovat zvláštní pozornost tomu, aby se zabránilo prudkému uvolňování par během varu. Navíc musí dojít k úplné kondenzaci v chladiči. Při stanovování tlaku par u nízkotajících pevných látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k ucpání chladiče.

Po zaznamenání naměřeného rovnovážného teplotního bodu se nastaví vyšší tlak. Takto se pokračuje, dokud se nedosáhne tlaku 10^5 Pa (celkem asi 5 až 10 bodů měření). Pro kontrolu se musí stanovení rovnovážných bodů opakovat při klesajících hodnotách tlaku.

1.5.2 **Statická metoda**

1.5.2.1 *Podstata*

Statickou metodou (5) se měří tlak par, který se ustaví při termodynamické rovnováze při dané teplotě. Tato metoda je vhodná pro látky a vícesložkové kapaliny a pevné látky v rozsahu od 10^{-1} do 10^5 Pa a při potřebné pečlivosti lze tuto metodu použít také pro oblast od 1 do 10 Pa.

▼**M1**

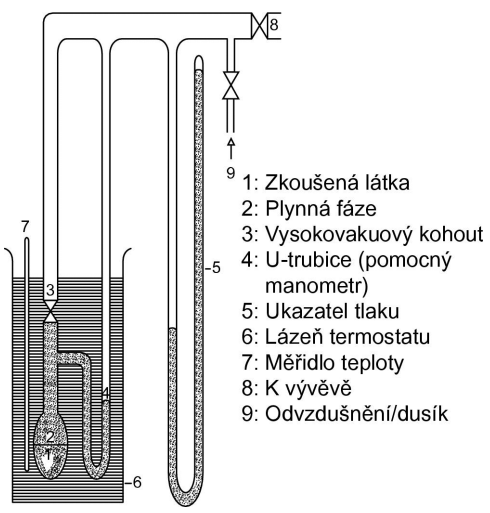
1.5.2.2 *Aparatura*

Zařízení se skládá z lázně o konstantní teplotě (preciznost ±0,2 K), zásobníku vzorku připojenému k podtlakovému potrubí, manometru a soustavy k regulaci tlaku. Baňka na vzorek (obrázek 3a) je připojena k podtlakovému potrubí přes ventil a diferenciální manometr (U-trubice obsahující vhodnou manometrickou kapalinu), který slouží jako ukazatel nuly. V závislosti na rozsahu tlaků a v závislosti na chemickém chování zkoušené látky jsou k použití v diferenciálním manometru vhodné rtuť, silikonové oleje a ftaláty. Avšak s ohledem na životní prostředí je třeba se vyvarovat použití rtuti, bude-li to možné. Zkoušená látka se nesmí znatelně rozpouštět ani nesmí reagovat s kapalinou v U-trubici. Namísto U-trubice lze použít manometr (obrázek 3b). V rozsahu od normálního tlaku do 10^2 Pa lze v manometru používat rtuť, zatímco silikonové oleje a ftaláty je vhodné používat pro tlaky pod 10^2 Pa až do 10 Pa. Existují též jiná měřidla tlaku, která lze použít pro tlak nižší než 10^2 Pa, a ohřívatelné membránové kapacitní manometry lze dokonce používat pro tlak nižší než 10^{-1} Pa. Teplota se měří na vnější stěně baňky se vzorkem nebo v baňce samotné.

1.5.2.3 *Postup měření*

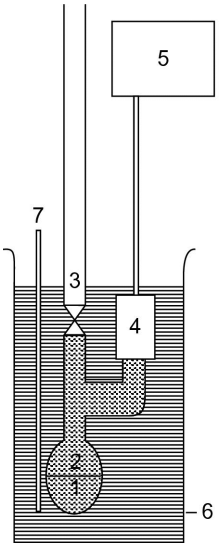
Při použití aparatury popsané na obrázku 3a se U-trubice naplní zvolenou kapalinou, která musí být před použitím odplyněna za zvýšené teploty. Zkoušená látka se vloží do aparatury a odplyní se za snížené teploty. V případě vícesložkového vzorku musí být teplota dostatečně nízká, aby se zajistilo, že se složení materiálu nezmění. Rovnováhy lze rychleji dosáhnout mícháním. Vzorek může být podchlazen kapalným dusíkem nebo suchým ledem, je ale nutno zabránit kondenzaci vzduchu nebo kapaliny z vývěvy. Při otevřeném ventilu nádoby se vzorkem se připojí na několik minut odsávání, aby se odstranil vzduch. Je-li to nutné, odplyňovací postup se několikrát opakuje.

Obrázek 3a



1: Zkoušená látka
2: Plynná fáze
3: Vysokovakuový kohout
4: U-trubice (pomocný manometr)
5: Ukazatel tlaku
6: Lázeň termostatu
7: Měřidlo teploty
8: K vývěvě
9: Odvzdušnění/dusík

Obrázek 3b



1: Zkoušená látka
2: Plynná fáze
3: Vysokovakuový kohout
4: Manometr
5: Ukazatel tlaku
6: Lázeň termostatu
7: Měřidlo teploty

▼M1

Při zahřívání vzorku za uzavřeného ventilu roste tlak par. To mění rovnováhu kapaliny v U-trubici. Aby se změna kompenzovala, připouští se ventilem dusík nebo vzduch do té doby, dokud není indikátor rozdílu tlaku opět na nule. Tlak potřebný k ustavení nulové hodnoty může být odečten přesným manometrem nebo přístrojem o vyšší preciznosti. Tento tlak odpovídá tenzi par látky při teplotě měření. Při použití aparatury popsané na obrázku 3b se tlak páry odečítá přímo.

Tlak par se stanoví ve vhodných krátkých intervalech teplot (celkem asi 5 až 10 bodů měření) až do požadovaného teplotního maxima.

Odečty při nízkých teplotách se musí pro kontrolu opakovat. Neleží-li hodnoty zjištěné z opakovaných odečtů na křivce zjištěné pro zvyšující se teplotu, může to být způsobeno jednou z těchto příčin:

i) vzorek stále obsahuje vzduch (např. u vysoce viskózních materiálů) nebo obsahuje látky s nízkým bodem varu, které jsou při zahřátí uvolňovány,

ii) v látce probíhá ve vyšetřovaném teplotní rozsahu chemická reakce (např. rozklad, polymerace).

1.5.3 **Metoda za použití isoteniskopu**

1.5.3.1 *Podstata*

Isoteniskop (6) vychází z podstaty statické metody. Metoda spočívá v uložení vzorku do baňky udržované při konstantní teplotě a připojené k manometru a vývěvě. Odplyněním za sníženého tlaku se odstraní nečistoty těkavější než vyšetřovaná látka. Tlak par vzorku při zvolených teplotách je vyrovnáván známým tlakem interního plynu. Isoteniskop byl vyvinut k měření tlaku par určitých kapalných uhlovodíků, ale hodí se rovněž k vyšetřování pevných látek. Metoda obvykle není vhodná pro vícesložkové systémy. U vzorků obsahujících netěkavé nečistoty jsou výsledky zatíženy pouze mírnými chybami. Doporučený rozsah je od 10^2 do 10^5 Pa.

1.5.3.2 *Aparatura*

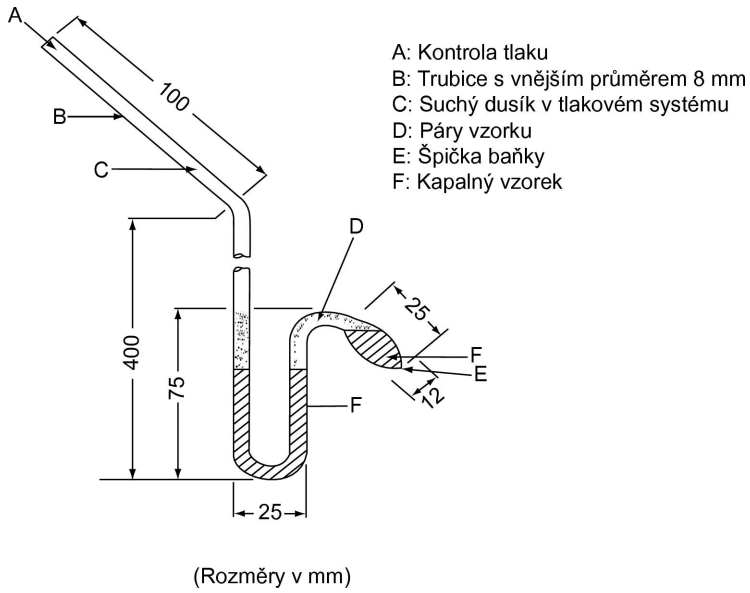
Příklad měřicího zařízení je zachycen na obrázku 4. Úplný popis lze nalézt v ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Postup měření*

V případě kapalin slouží látka samotná jako indikační sloupec v diferenciálním manometru. Do isoteniskopu se odměří množství kapaliny postačující k naplnění baňky a krátkého ramene manometru. Isoteniskop se připojí k vakuovému systému, evakuuje se a poté se naplní dusíkem. Evakuace a výplach systému se opakuje dvakrát, aby se odstranil veškerý zbytkový kyslík. Naplněný isoteniskop se umístí do horizontální polohy, aby se vzorek rozprostřel v tenké vrstvě v baňce se vzorkem a v manometru. Tlak v systému se sníží na 133 Pa a vzorek se opatrně zahřeje právě k varu (odstranění rozpuštěných plynů). Poté se isoteniskop vrátí do původní polohy tak, aby se vzorek vrátil do baňky a krátkého ramene manometru. Tlak se udržuje na 133 Pa. Špička baňky se vzorkem se ohřívá malým plamenem, dokud uvolněná pára vzorku neexpanduje natolik, že přetlačí část vzorku z horní části baňky a ramene manometru do manometru, přičemž se vytvoří prostor bez dusíku naplněný výhradně parami. Isoteniskop se poté vloží do lázně se stálou teplotou a tlak dusíku se upraví tak, aby se rovnal tlaku vzorku. V rovnováze se rovná tlak dusíku tenzi par látky.

Obrázek 4



(Rozměry v mm)

U pevných látek se v závislosti na oblasti tlaku a teploty používají manometrické kapaliny, jako jsou například silikonové kapaliny nebo ftaláty. Odplyněná manometrická kapalina se naplní do rozšířené části dlouhého ramene isoteniskopu. Poté se vyšetřovaná látka naplní do baňky a odplyní se při zvýšené teplotě. Isoteniskop se poté nakloní, aby manometrická kapalina natekla do U-trubice.

▼**M1**

1.5.4 **Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par** (7)

1.5.4.1 *Podstata*

Vzorek zkoušené látky se ohřeje v malé pícce a umístí se pod evakuovaný skleněný zvon. Pícka se zakryje víkem, které má malé otvory o známém průměru. Pára látky unikající jedním z otvorů je vedena na misku vysoce citlivých vah, která je rovněž umístěna pod evakuovaným skleněným zvonem. U některých konstrukcí je miska vah uzavřena v chladicím bloku, který zajišťuje rozptyl tepla do vnějšího okolí vedením tepla, a je ochlazována vyzařováním tak, aby unikající pára na ní kondenzovala. Hybnost proudu par působí jako síla proti misce vah. Tlak par lze odvodit dvěma způsoby: přímo ze síly působící na misku vah a rovněž z rychlosti vypařování s využitím Hertzovy-Knudsenovy rovnice (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

kde:

G = rychlost vypařování (kg s^{-1} m^{-2}),

M = molární hmotnost (g mol^{-1}),

T = termodynamická teplota (K),

R = univerzální molární plynová konstanta, (J mol^{-1} K^{-1}),

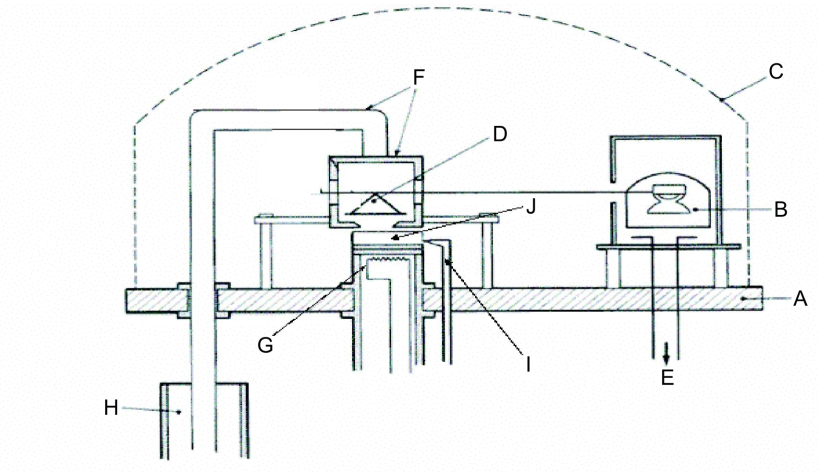
p = tlak páry (Pa).

Doporučený rozsah je od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 5.

Obrázek 5



A: Základní deska

B: Přístroj s pohyblivou cívkou

C: Skleněný zvon

D: Miska vah se stupnicí

E: Zařízení pro měření vakua

F: Chladicí blok a chladicí tyč

G: Odpařovací pícka

H: Dewarova nádoba s kapalným dusíkem

I: Měření teploty vzorku

J: Zkoušená látka

▼**M1**

1.5.5 **Efusní metoda: Knudsenova komůrka**

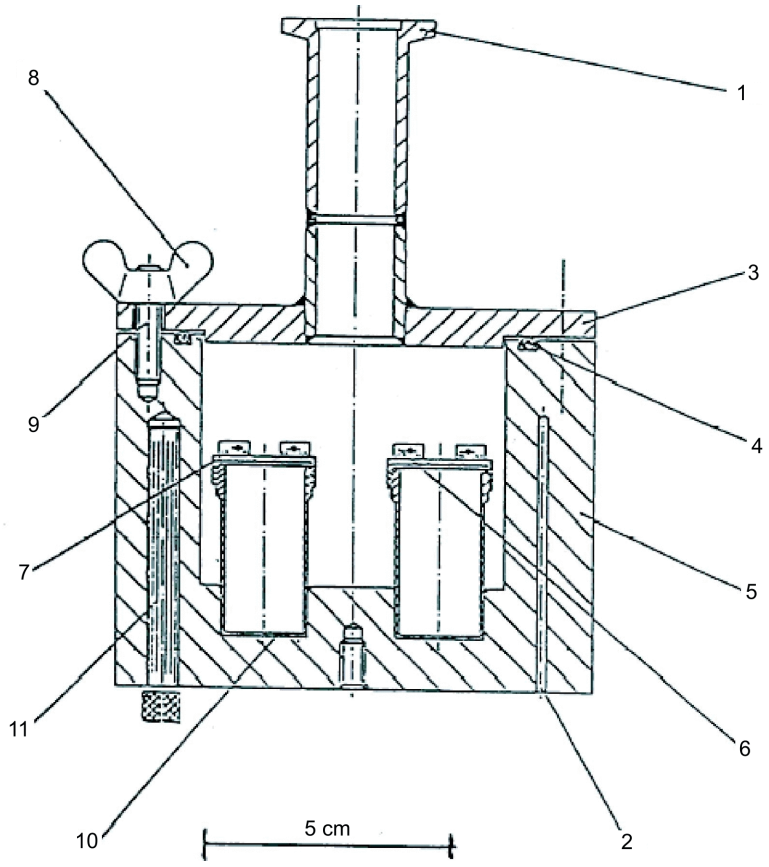
1.5.5.1 *Podstata*

Metoda je založena na odhadu hmotnosti par zkoušené látky unikající za jednotku času z Knudsenovy komůrky (8) mikrodýzou za podmínek vysokého vakua. Hmotnost difundujících par může být zjištěna buď stanovením úbytku hmotnosti komůrky nebo kondenzací par při nízké teplotě a stanovením jejich množství chromatografickou analýzou. Tlak par se vypočte za použití Hertzovy-Knudsenovy rovnice (viz bod 1.5.4.1) pomocí korekčních faktorů, které závisí na parametrech přístroje (9). Doporučený rozsah je od 10^{-10} do 1 Pa (10, 11, 12, 13, 14).

1.5.5.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 6.

Obrázek 6



1: Přípojka k vakuu

2: Otvory pro platinový odporový teploměr nebo pro systém měření a kontroly teploty

3: Víko vakuového bloku

4: O-kroužek

5: Hliníkový vakuový blok

6: Zařízení pro zasouvání a vytahování efusních komůrek

7: Šroubovací víko

8: Křídlové matice

9: Šrouby

10: Efusní komůrky z korozivzdorné oceli

11: Topné těleso

▼M1

1.5.6 **Efusní metoda: isotermální termogravimetrie**

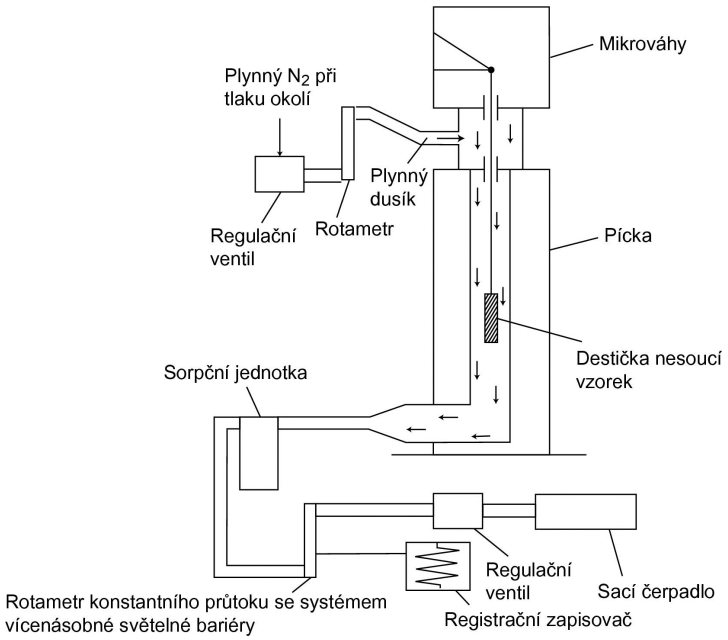
1.5.6.1 *Podstata*

Metoda je založena na stanovení zvýšených rychlostí vypařování zkoušené látky při zvýšených teplotách a tlaku okolí s využitím termogravimetrie (10, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Rychlosti vypařování v_T jsou výsledkem vystavení zvolené sloučeniny působení pomalu protékajícího inertního plynu, přičemž se sleduje úbytek hmotnosti při definovaných isotermálních teplotách T v kelvinech během příslušných časových období. Tlaky par p_T se vypočítají z hodnot v_T s využitím lineární závislosti mezi logaritmem tlaku par a logaritmem rychlosti vypařování. V případě potřeby lze provést extrapolaci na teploty 20 °C a 25 °C regresní analýzou log p_T versus $1/T$. Tato metoda je vhodná pro látky s tlakem páry na úrovni 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) při čistotě co nejvíce se blížící 100 %, aby se zabránilo chybné interpretaci naměřených hmotnostních úbytků.

1.5.6.2 *Aparatura*

Obecný princip měřicí soustavy je zachycen na obrázku 7.

Obrázek 7



Destička nesoucí vzorek, zavěšená na mikrováhách v komůrce s kontrolovanou teplotou, je vlečena proudem suchého plynného dusíku, který unáší molekuly par zkoušené látky. Po průchodu komůrkou se proud plynu čistí v sorpční jednotce.

1.5.6.3 *Postup měření*

Zkoušená látka se nanese na povrch zdrsněné skleněné destičky jako homogenní vrstva. U pevných látek se destička rovnoměrně navlhčí roztokem látky ve vhodném rozpouštědle a vysuší se v inertní atmosféře. Pro měření se pokrytá destička zavěsí na termogravimetrický analyzátor a následně se průběžně měří úbytek hmotnosti jako funkce času.

▼M1

Rychlost vypařování v_T při určité teplotě se vypočítá ze ztráty hmotnosti Δm destičky se vzorkem pomocí rovnice

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}}\right)$$

kde F je plocha povrchu pokrytého zkoušenou látkou, obvykle je to povrchová plocha destičky se vzorkem, a t je čas, během něhož dojde k úbytku hmotnosti Δm.

Tlak par p_T se vypočítá jako funkce rychlosti vypařování v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = \mathrm{C} + \mathrm{D}\ \log\ v_T$$

kde C a D jsou konstanty specifické pro použité experimentální uspořádání v závislosti na průměru měřicí komůrky a rychlosti toku plynu. Tyto konstanty se musí jednorázově stanovit měřením množiny sloučenin se známým tlakem par a určit pomocí lineární regrese ze závislosti log p_T na log v_T (11, 21, 22).

Vztah mezi tlakem par p_T a teplotou T v kelvinech popisuje rovnice

$$\mathrm{Log}\ p_T = \mathrm{A} + \mathrm{B}\ 1/T$$

kde A a B jsou konstanty získané lineární regresí ze závislosti log p_T na $1/T$. Pomocí této rovnice lze vypočítat tlak par extrapolací pro jakoukoliv teplotu.

1.5.7 **Metoda nasycení plynu** (23)

1.5.7.1 *Podstata*

Inertní plyn se vede při pokojové teplotě a známém průtoku přes vzorek zkoušené látky nebo nad ním, a to dostatečně pomalu, aby bylo zajištěno nasycení. Dosažení nasycení v plynné fázi je zásadně důležité. Transportovaná látka se zachytí, obvykle za použití sorbentu, a stanoví se její množství. Jako alternativní metody zachycení páry a následné analýzy mohou být ke stanovení množství hmoty transportovaného materiálu použity průtokové analytické techniky, jako je plynová chromatografie. Tlak par se vypočítá s tím, že se předpokládá platnost zákona o ideálním plynu a že celkový tlak směsi plynů je roven součtu tlaků plynných složek. Dílčí tlak zkoušené látky, tj. tlak par, se vypočítá ze známého celkového objemu plynu z hmotnosti transportovaného materiálu.

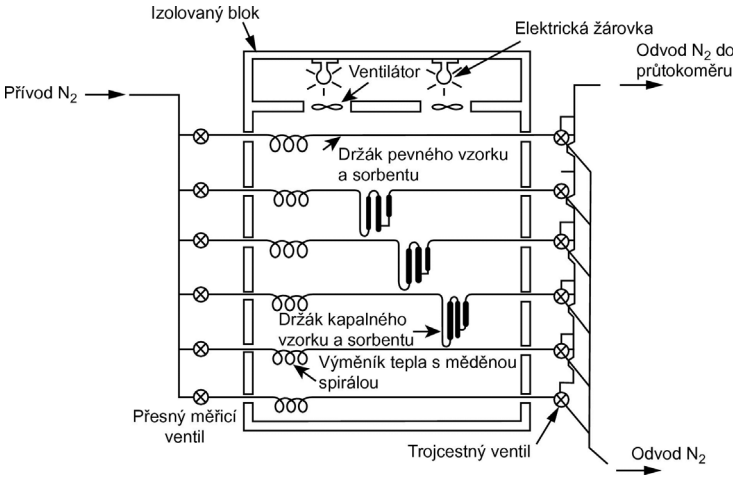
Metoda nasycení plynu je použitelná u pevných nebo kapalných látek. Lze ji použít pro tlaky par do 10^{-10} Pa (10, 11, 12, 13, 14). Metoda je nejspolehlivější pro tlaky par nižší než 10^3 Pa. Při tlaku nad 10^3 Pa jsou tlaky par všeobecně nadsazené, pravděpodobně kvůli tvorbě aerosolu. Protože se měření tlaku par provádí při pokojové teplotě, není nezbytné extrapolovat údaje získané za vysokých teplot a extrapolace vysokých teplot, která často způsobuje závažné chyby, se neprovádí.

1.5.7.2 *Aparatura*

Proces vyžaduje použití bloku s konstantní teplotou. Nákres na obrázku 8 ukazuje blok obsahující tři držáky pevných vzorků a tři držáky kapalných vzorků, které umožňují trojitou analýzu buď pevného, nebo kapalného vzorku. Teplota je regulována s precizností ±0,5 °C nebo lepší.

▼**M1**

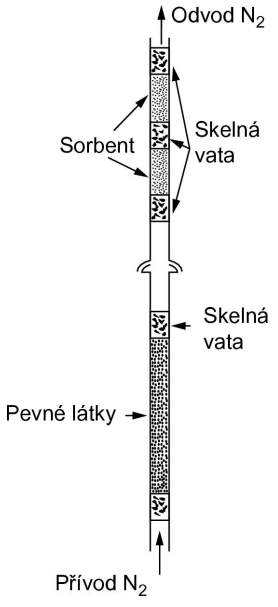
Obrázek 8



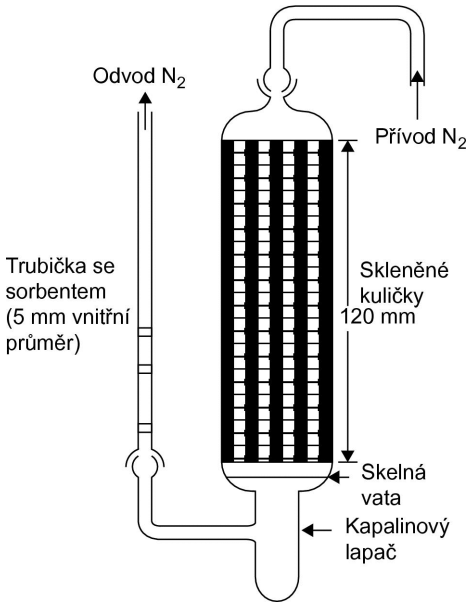
Obecně se jako inertní nosný plyn používá dusík, ale někdy může být nutno použít jiný plyn (24). Nosný plyn musí být suchý. Proud plynu se rozdělí do 6 proudů ovládaných jehlovými ventily (otvor přibližně 0,79 mm) a protéká do bloku měděnou trubkou o vnitřním průměru 3,8 mm. Po vyrovnání teplot plyn protéká okolo vzorku a sorbentovým lapačem a vychází z bloku.

Pevné vzorky se umístí do trubice o vnitřním průměru 5 mm mezi zátky ze skelné vaty (viz obrázek 9). Obrázek 10 ukazuje držák kapalného vzorku a systém se sorbentem. Metoda pro měření tlaku par kapalin s nejvyšší reprodukovatelností spočívá v nanesení kapaliny na skleněné kuličky nebo na inertní sorbent, například na oxid křemičitý, a obalení držáku těmito kuličkami. Druhou možností je nechat procházet nosný plyn hrubou fritou a probublávat sloupcem s kapalnou zkoušenou látkou.

Obrázek 9



Obrázek 10



▼M1

Systém se sorbentem obsahuje přední a zadní část se sorbentem. Při velmi nízkých tlacích páry se na sorbentu zachytí pouze malá množství a adsorpce na skelné vatě a ve skleněném potrubí mezi vzorkem a sorbentem může představovat závažný problém.

Lapače chlazené pevným CO_2 jsou dalším účinným způsobem pro zachytávání materiálu v podobě par. Nevyvolávají žádný protitlak v sytící koloně a rovněž lze snadno kvantitativně odstranit zachycený materiál.

1.5.7.3 *Postup měření*

Průtok vytékajícího nosného plynu se měří při pokojové teplotě. Průtok se během experimentu často kontroluje, aby se zajistilo, že je přesně zjištěna hodnota celkového objemu nosného plynu. Dává se přednost nepřetržitému sledování hmotnostním průtokoměrem. Nasycení plynné fáze může vyžadovat značnou kontaktní dobu, a tím i dosti nízké průtoky plynu (25).

Po skončení experimentu se samostatně analyzují jak přední, tak zadní část se sorbentem. Sloučenina v každé části se desorbuje přidáním rozpouštědla. Výsledné roztoky se analyzují kvantitativně, aby se stanovila hmotnost desorbovaná z každé části. Volba analytické metody (rovněž volba sorbentu a desorbčního rozpouštědla) je určována povahou zkoušeného materiálu. Účinnost desorpce je stanovena vstříknutím známého množství vzorku do sorbentu, jeho desorpcí a analýzou zpětně získaného množství. Je důležité kontrolovat účinnost desorpce při koncentraci vzorku za podmínek zkoušení nebo v její blízkosti.

Aby bylo zajištěno nasycení nosného plynu zkoušenou látkou, používají se tři odlišné průtoky plynu. Jestliže vypočítaný tlak par nevykazuje závislost na průtoku, předpokládá se nasycení plynu.

Tlak par se vypočítá pomocí rovnice:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

kde:

p = tlak páry (Pa),

W = hmotnost odpařené zkoušené látky (g),

V = objem nasyceného plynu (m^3),

R = univerzální molární plynová konstanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1}),

T = termodynamická teplota (K),

M = molární hmotnost zkoušené látky (g mol^{-1}).

Naměřené objemy musí být korigovány v důsledku rozdílů tlaků a teplot mezi průtokoměrem a sytící kolonou.

▼M1

1.5.8 **Metoda rotujícího tělíska**

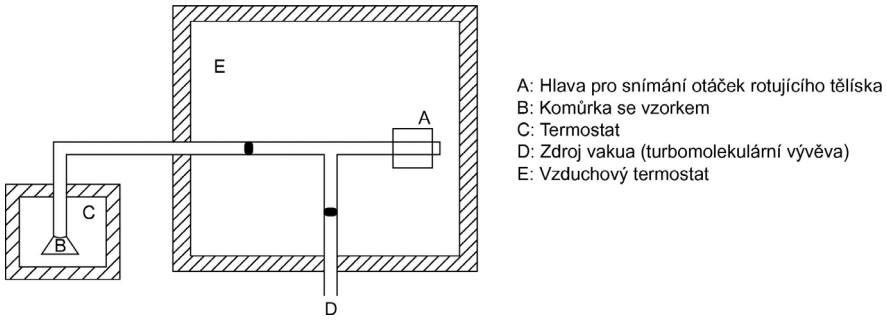
1.5.8.1 *Podstata*

Tato metoda využívá měřiče viskozity s rotujícím tělískem, kde je měřicím prvkem malá ocelová kulička zavěšená v magnetickém poli, která je uváděna do rotačního pohybu rotujícími magnetickými poli (26, 27, 28). Zvedací cívky umožňují měření rotační rychlosti. Když kulička dosáhne stanovené rotační rychlosti, obvykle přibližně 400 otáček za sekundu, zastaví se další napájení a zahájí se zpomalování vyvolané brzdicím účinkem plynu. Pokles rotační rychlosti je měřen jako funkce času. Tlak par je odvozen ze zpomalení rotující ocelové kuličky v závislosti na tlaku. Doporučený rozsah je od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Aparatura*

Schematický nákres měřicí soustavy je zachycen na obrázku 11. Měřicí hlava je umístěna v prostoru s konstantní teplotou, v němž je teplota regulována s přesností na 0,1 °C. Nádobka se vzorkem je umístěna do samostatného prostoru, v němž je teplota rovněž regulována s přesností na 0,1 °C. Všechny ostatní části soustavy jsou udržovány při vyšší teplotě, aby nedocházelo ke kondenzaci. K zařízení se připojí vysokovakuová výměva.

Obrázek 11



2. **DATA A ZPRÁVY**

2.1 DATA

Stanovení tlaku par kteroukoli z výše popsaných metod by se mělo provést nejméně při dvou teplotách. Aby se ověřil lineární průběh křivky tlaku par v oblasti teplot od 0 °C do 50 °C, doporučuje se měření při třech nebo více teplotách. V případě efusní metody (Knudsenova komůrka a isotermální termogravimetrie) a metody nasycení plynu se jako rozsah měřicích teplot doporučuje 120 °C až 150 °C namísto 0 °C až 50 °C.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

▼M1

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— nejméně dvě hodnoty tlaku par a teploty – pokud možno tři či více – v oblasti 0 °C až 50 °C (nebo 120 °C až 150 °C),

— nejméně jedna z teplot by měla činit 25 °C nebo méně, bude-li to technicky proveditelné při zvolené metodě,

— všechny původní údaje,

— křivka závislosti log p na $1/T$,

— odhadnutá hodnota tlaku par při 20 °C nebo 25 °C.

Zjistí-li se změna stavu (fázový přechod, rozklad), měly by být uvedeny tyto skutečnosti:

— druh změny,

— teplota při atmosférickém tlaku, při k které ke změně dochází,

— hodnoty tlaku par při 10 °C a 20 °C pod teplotou přechodu a nad teplotou přechodu (s výjimkou přechodů z pevného do plynného skupenství).

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3. LITERATURA

(1) *Úřední věstník Evropských společenství* L 383 A, 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., Vodar, B., (*eds*.), Butterworths, London.

(3) Weissberger R., (*ed*.) (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

(6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz*., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521–532.

(11) Tomlin, C.D.S. (*ed*.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog*. 16 (1964), 22–28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269–278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117–122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137–147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393–400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161–168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27–31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300–310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87-(12) (1998) 1512–20.

(21) Lide, D.R. (*ed*.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (*ed*.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). s. 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.

(25) Westcott *et al*. (1981). *Environ. Sci. Technol*. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol*. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol*. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol*. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Dodatek

Metoda odhadu

ÚVOD

Odhadnuté hodnoty tlaku par lze využít:

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná,

— k provedení odhadu nebo ke stanovení mezní hodnoty v případech, kdy nelze z technických důvodů použít experimentální metodu.

METODA ODHADU

Tlak par kapalin a pevných látek může být odhadnut pomocí modifikovaného Watsonova korelačního vztahu (a). Požaduje se pouze jeden experimentální údaj, a to teplota varu za normálního tlaku. Metoda je použitelná pro tlaky od 10^5 do 10^{-5} Pa.

Podrobné informace o metodě jsou uvedeny v příručce *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (b). Viz rovněž OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

POSTUP VÝPOČTU

Tlak par se vypočte podle vzorce:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

kde:

T = teplota, pro kterou je tlak par vypočítáván,

T_b = teplota varu při normálním tlaku,

P_{vp} = tlak par při teplotě T,

ΔH_{vb} = výparné teplo,

ΔZ_b = faktor stlačitelnosti (použije se hodnota 0,97),

m = empirický faktor, jehož hodnota závisí na fyzikálním stavu při teplotě, pro níž je prováděn výpočet.

Dále

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8{,}75 + R \ln T_b)$$

kde K_F je empirický součinitel zohledňující polaritu látky. V příručce (b) jsou uvedeny hodnoty faktoru K_F pro několik typů sloučenin.

▼**M1**

Velmi často jsou k dispozici data o teplotě varu při sníženém tlaku. V takovém případě se tlak par vypočte podle tohoto vztahu:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

kde T_1 je teplota varu při sníženém tlaku P_1.

ZPRÁVA

Je-li použita metoda odhadu, musí zpráva obsahovat úplný postup výpočtu.

LITERATURA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem., 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

1. METODA

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody jsou určeny pro měření povrchového napětí vodných roztoků.

Před provedením těchto zkoušek je vhodné mít k dispozici předběžné informace o rozpustnosti látky ve vodě, o její struktuře, o hydrolýze a o kritické koncentraci pro tvorbu micel.

Níže uvedené metody jsou použitelné pro většinu chemických látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Měření povrchového napětí metodou prstencového tenziometru je omezeno na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižší než přibližně 200 mPa/s.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Povrchová volná enthalpie vztažená na jednotku povrchu se nazývá povrchové napětí.

Povrchové napětí se vyjadřuje těchto jednotkách:

N/m (v soustavě SI) nebo

mN/m (odvozená jednotka v soustavě SI)

1 N/m= 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm ve staré soustavě CGS

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Referenční látky, které pokrývají široké rozpětí hodnot povrchového napětí, jsou uvedeny v literatuře (1, 3).

1.4 PODSTATA METOD

Metody jsou založeny na měření největší síly, kterou je nutné působit ve svislém směru na třmínek nebo prstenec, který se dotýká povrchu zkoumané kapaliny umístěné v měřicí nádobě, aby se od tohoto povrchu oddělil, nebo na destičku, která se svým okrajem dotýká povrchu, aby se vzniklý film vytáhl nahoru.

Látky, jejichž rozpustnost ve vodě dosahuje hodnoty alespoň 1 mg/1, se zkoušejí ve vodných roztocích při jedné koncentraci.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Přesnost těchto metod je pravděpodobně vyšší, než je požadováno pro účely hodnocení stavu životního prostředí.

▼B

1.6 POPIS METOD

Připraví se roztok látky v destilované vodě. Koncentrace roztoku by měla být 90 % koncentrace nasyceného roztoku látky ve vodě; pokud tato koncentrace přesáhne 1 g/l, použije se k měření roztok o koncentraci 1 g/l. Látky, jejichž rozpustnost je menší než 1 mg/l, není nutné zkoušet.

1.6.1 **Destičková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2 **Třmínková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3 **Prstencová metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4 **Harmonizovaná prstencová metoda OECD**

1.6.4.1. *Aparatura*

Pro toto měření jsou vhodné komerční tenziometry. Skládají se z těchto částí:

— pohyblivý stolek pro vzorek,

— systém měření síly,

— měřicí tělísko,

— měřicí nádoba.

1.6.4.1.1 Pohyblivý stolek pro vzorek

Pohyblivý stolek pro vzorek slouží jako podložka pro termostatovanou měřicí nádobu, ve které je kapalina, která má být zkoušena. Spolu se systémem měření síly je upevněn na stojanu.

1.6.4.1.2 Systém měření síly

Systém měření síly je umístěn nad stolkem pro vzorek (viz obrázek). Chyba měření síly nemá překročit ± 10^{-6} N, což odpovídá chybě ± 0,1 mg při měřeni hmotnosti. Ve většině případů je měřicí stupnice komerčních tenziometrů dělena v mN/m, takže je možné povrchové napětí odečítat přímo v mN/m s přesností na 0,1 mN/m.

▼B

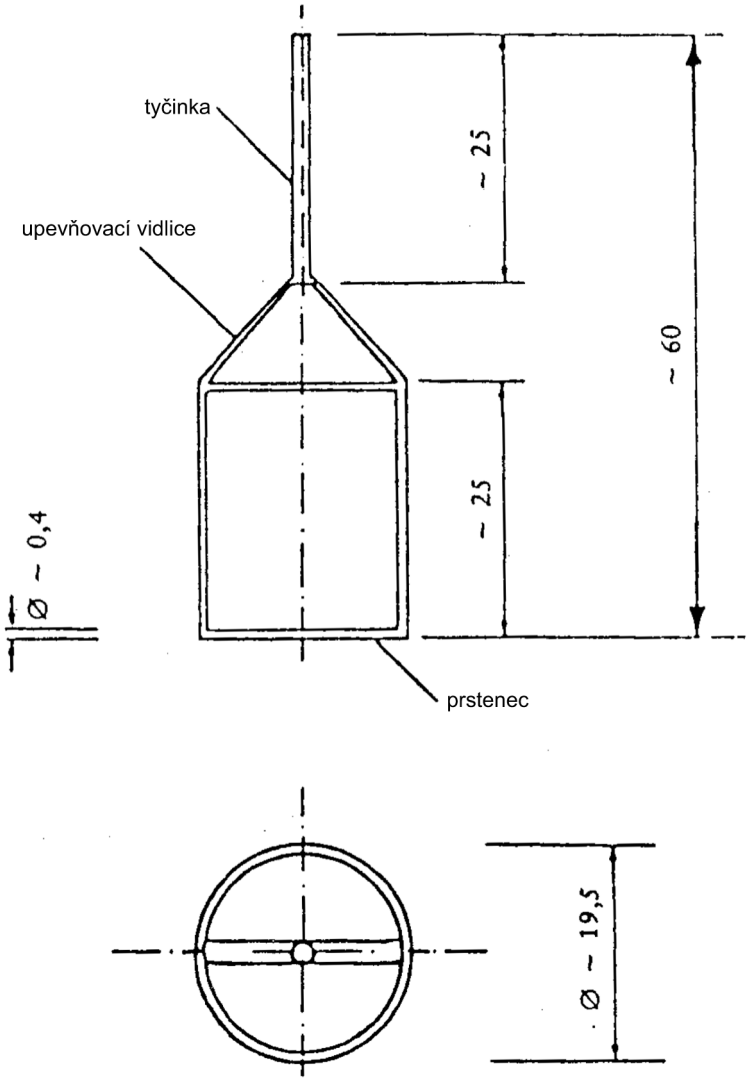
1.6.4.1.3 Měřicí tělísko (prstenec)

Prstenec je obvykle zhotoven z platino-iridiového drátu o průměru asi 0,4 mm a středním obvodu 60 mm. Prstenec z drátu je zavěšen vodorovně na upevňovací vidlici z drátu a na kovové tyčince, která tvoří spojení k systému měření síly (viz obrázek).

Obrázek

Měřicí tělísko

(všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech)



1.6.4.1.4 Měřicí nádoba

Měřicí nádobou pro zkušební roztok je termostatovaná skleněná nádoba. Má být konstruována tak, aby teplota zkoumané kapaliny i plynné fáze nad jejím povrchem zůstala během měření konstantní a aby se vzorek nemohl odpařovat. Vhodná je válcová skleněná nádoba o vnitřním průměru nejméně 45 mm.

▼B

1.6.4.2 *Příprava aparatury*

1.6.4.2.1 Čištění

Skleněné nádoby je třeba pečlivě vyčistit. Pokud je to nutné, měly by se vymýt horkou kyselinou chromsírovou a následně koncentrovanou kyselinou fosforečnou (83 až 98 % hmot. H_3PO_4), pečlivě vypláchnout tekoucí vodou a nakonec omýt redestilovanou vodou do neutrální reakce a následně vysušit nebo vypláchnout vzorkem kapaliny, která má být měřena.

Prstenec je třeba nejprve pečlivě umýt vodou, aby se odstranily všechny látky rozpustné ve vodě. Poté se krátce ponoří do kyseliny chromsírové, opláchne se v redestilované vodě do neutrální reakce a nakonec se krátce ohřeje nad methanolovým plamenem.

Poznámka:

Znečištění látkami, které se nerozpouštějí ani nerozkládají kyselinou chromsírovou ani kyselinou fosforečnou, jako například silikony, je nutné odstraňovat vhodnými organickými rozpouštědly.

1.6.4.2.2 Kalibrování aparatury

Validace aparatury spočívá v ověření nuly a v nastavení přístroje tak, aby jeho data umožňovala spolehlivé stanovení v mN/m.

Poloha:

Přístroj musí být nastaven do vodorovné polohy, např. pomocí libely položené na základovou desku tenziometru a nastavením stavěcích šroubů základnové desky.

Nastavení nuly:

Po upevnění prstence na aparatuře a před ponořením do kapaliny je třeba nastavit nulu ukazatele tenziometru a zkontrolovat rovnoběžnost prstence s hladinou kapaliny. K tomu je možné použít hladiny kapaliny jako zrcadla.

Kalibrace:

Vlastní kalibraci před měřením je možné provést dvěma postupy:

a) Použitím závaží: při tomto postupu se použijí jezdce o známé hmotnosti od 0,1 g do 1,0 g, které se umístí na prstenec. Kalibrační faktor Φ_a, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

kde:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b}\ (\text{mN/m})$$

m = hmotnost jezdce (g),

g = tíhové zrychlení (981 cm s^{-2} na úrovni hladiny moře),

b = střední obvod prstence (cm)

σ_a = odečtená hodnota na tenziometru po umístění jezdců na prstenec (mN/m).

▼B

b) Použitím vody: při tomto postupu se použije čistá voda, jejíž povrchové napětí má při 23 °C hodnotu 72,3 mN/m. Tento postup lze provést rychleji než kalibraci se závažími, ale existuje vždy nebezpečí, že povrchové napětí vody je zkresleno stopovým znečištěním povrchově aktivními látkami.

Kalibrační faktor Φ_b, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

kde:

σ_o = hodnota povrchového napětí vody uvedená v literatuře (mN/m),

σ_g = naměřená hodnota povrchového napětí vody (mN/m), obě při stejné teplotě.

1.6.4.3 *Příprava vzorků*

Připraví se vodné roztoky zkoušených látek o požadované koncentraci, které nesmějí obsahovat nerozpuštěné složky.

Roztoky musí být udržovány při konstantní teplotě (± 0,5 °C). Protože se povrchové napětí roztoku v měřicí nádobě v čase mění, provedou se měření v různých časech a sestrojí se křivka závislosti povrchového napětí na čase. Nedochází-li k žádným dalším změnám, bylo dosaženo rovnovážného stavu.

Měření je ovlivňováno znečištěním prachem nebo plynnými látkami. Práce musí být tedy prováděny pod ochranným krytem.

1.6.5 **Zkušební podmínky**

Měření se provádí přibližně při 20 °C a udržuje se tolerance ± 0,5 °C.

1.6.6 **Postup zkoušky**

Roztoky, které mají být měřeny, se převedou do pečlivě vyčištěné měřicí nádoby, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo k pěnění, a nádoba se poté postaví na stolek zkušební aparatury. Horní část stolku s měřicí nádobou se vysune tak vysoko, aby se prstenec ponořil pod povrch roztoku, který má být měřen. Horní část stolku se následně postupně a rovnoměrně sníží (rychlostí přibližně 0,5 cm/-min), aby došlo k oddělení prstence od povrchu, a to až do dosažení maximální hodnoty síly. Film kapaliny lpící na prstenci se od něho nesmí odtrhnout. Po ukončení měření se prstenec opět ponoří pod povrch a postup se opakuje až do dosažení konstantní hodnoty povrchového napětí. Při každém stanovení se začne zaznamenávat čas v okamžiku plnění roztoku do měřicí nádoby. Odečty se provedou vždy v okamžiku, kdy je dosaženo maximální síly nutné pro oddělení prstence od povrchu kapaliny.

▼B

2. **DATA**

Za účelem výpočtu povrchového napětí se hodnota odečtená na přístroji v mN/m nejprve vynásobí kalibračním faktorem Φ_a nebo Φ_b (podle použitého postupu kalibrace). Získá se tak hodnota, která však platí pouze přibližně, a vyžaduje proto korekci.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekční faktory pro hodnoty povrchového napětí měřeného prstencovou metodou, které závisí na rozměrech prstence, hustotě kapaliny a jejím povrchovém napětí.

Vzhledem k tomu, že je zdlouhavé stanovovat pro každé jednotlivé měření korekční faktor z tabulek Harkinse a Jordana, lze pro výpočet povrchového napětí vodných roztoků použít zjednodušenou metodu, která spočívá v odečtu korigovaných hodnot povrchového napětí přímo z tabulky. (Pro odečtené hodnoty, které leží mezi hodnotami uvedenými v tabulce, se provede interpolace.)

Tabulka

Korekce naměřených hodnot povrchového napětí

Pouze pro vodné roztoky $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (střední poloměr prstence)
r	= 0,185 mm (poloměr drátu prstence)

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,5
	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
58	53,2	57
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabulka byla sestavena na základě korekcí podle Harkinse a Jordana. Je obdobou tabulky podle normy DIN 53914 pro vodu a vodné roztoky (hustota p = 1 g/cm^3); platí pro běžný komerční prstenec o rozměrech R = 9,55 mm (střední poloměr prstence) a r = 0,185 mm (poloměr drátu prstence). Tabulka udává korigované hodnoty pro měření povrchového napětí získané po kalibraci závažími nebo vodou.

Jiným řešením je vypočítat povrchové bez předchozí kalibrace podle rovnice:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

kde:

F = síla udaná měřicím systémem při oddělení filmu,

R = poloměr prstence,

f = korekční faktor (1).

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— druh vody nebo použitého roztoku,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky měření: povrchové napětí (odečtené hodnoty) s uvedením jednotlivých odečtených hodnot a jejich aritmetického průměru a rovněž korigované střední hodnoty (přičemž se bere v úvahu kalibrační faktor a tabulka korekcí),

▼B

— koncentrace roztoku,

— zkušební teplota,

— stáří použitého roztoku, zejména časový odstup mezi přípravou roztoku a měřením,

— znázornění časové závislosti povrchového napětí po převedení roztoku do měřicí nádoby,

— uvedou se všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Vzhledem k tomu, že povrchové napětí vody je 72,75 mN/m při 20°C, měly by být látky vykazující za podmínek této metody povrchové napětí menší než 60 mN/m považovány za povrchově aktivní materiály.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 105 (1995). Tato zkušební metoda je revidovanou verzí původních pokynů TG 105, které byly přijaty v roce 1981. Současná verze se obsahově od verze z roku 1981 neliší. Změnil se převážně formát textu. Revize vycházela ze zkušební metody EU „Rozpustnost ve vodě“ ([1]).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. Rozpustnost látky ve vodě může být značně ovlivněna přítomností nečistot. Tato zkušební metoda se zabývá stanovením rozpustnosti ve vodě u víceméně čistých látek, které jsou stabilní ve vodě a nejsou těkavé. Před stanovením rozpustnosti ve vodě je vhodné mít k dispozici předběžné informace o zkoušené chemické látce, například o strukturním vzorci, tlaku par, disociační konstantě a hydrolýze jako funkci pH.

3. V této zkušební metodě jsou popsány dvě metody, a sice sloupcová eluční metoda pro rozpustnost nižší než 10^{-2} g/l a baňková metoda pro rozpustnost vyšší. Rovněž je zde popsána jednoduchá předběžná zkouška. Ta umožňuje přibližně stanovit vhodné množství vzorku, který se má použít v konečné zkoušce, a rovněž dobu nezbytnou k dosažení saturace.

DEFINICE A JEDNOTKY

4. Rozpustnost látky ve vodě je veličina udávající hmotnostní koncentraci jejího nasyceného vodného roztoku při dané teplotě.

5. Rozpustnost ve vodě se vyjadřuje jako hmotnost rozpuštěné látky v objemu roztoku. Jednotkou v soustavě SI je kg/m^3, ale může se používat také g/l.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

6. Při vyšetřování zkoušené chemické látky není nutné používat referenční chemické látky.

POPIS METOD

Zkušební podmínky

7. Zkouška se provádí optimálně při teplotě 20 ± 0,5 °C. Zvolenou teplotu je třeba udržovat ve všech důležitých částech aparatury konstantní.

Předběžná zkouška

8. Ke vzorku o hmotnosti přibližně 0,1 g (pevné zkoušené chemické látky musí být v práškové formě) umístěnému do odměrného válce o objemu 10 ml uzavíratelného skleněnou zátkou se při laboratorní teplotě přidávají po krocích neustále narůstající objemy vody. Po každém přidání dílčího objemu vody se směsí intenzivně třepe po dobu 10 minut a vizuálně se kontroluje obsah nerozpuštěných částic vzorku. Zůstanou-li vzorek nebo jeho část po přidání 10 ml vody nerozpuštěny, pokračuje se v experimentu v odměrném válci o objemu 100 ml. Přibližná rozpustnost

▼M4

je uvedena v tabulce 1 pod objemem vody potřebným k úplnému rozpuštění vzorku. Je-li rozpustnost nízká, může být doba potřebná k rozpuštění zkoušené chemické látky dlouhá a je třeba vyčkat alespoň 24 hodin. Není-li zkoušená chemická látka ani po 24 hodinách rozpuštěna, je třeba vyčkat delší dobu (až 96 hodin) nebo se pokusit o další ředění, aby se zjistilo, zda by se měla použít sloupcová eluční metoda nebo baňková metoda.

Tabulka 1

ml vody na 0,1 g rozpouštěné látky	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
přibližná rozpustnost v g/l	> 1 000	1 000–2-00	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Sloupcová eluční metoda

Podstata

9. Tato metoda je založena na vymývání zkoušené chemické látky vodou z mikrokolony naplněné inertním nosičem pokrytým přebytkem zkoušené chemické látky (2). Rozpustnost ve vodě udává hmotnostní koncentrace eluátu poté, co dosáhla rovnovážného nasycení v závislosti na čase.

Aparatura

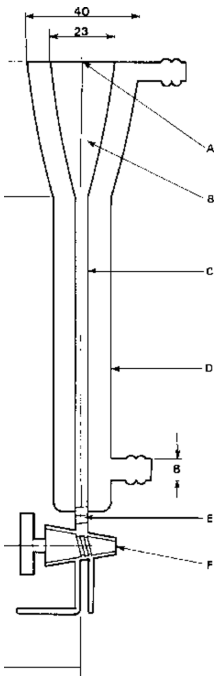
10. Aparatura se skládá z mikrokolony (obrázek 1) udržované při konstantní teplotě. Je připojena buď k oběhovému čerpadlu (obrázek 2) nebo k vyrovnávací nádobě (obrázek 3). Mikrokolona obsahuje inertní nosič, který je fixován na místě pomocí malého smotku skelné vaty, který současně slouží k odfiltrování částeček. Materiály, které lze použít jako nosič, jsou skleněné kuličky, infuzoriová hlinka nebo jiné inertní materiály.

11. Mikrokolona na obrázku 1 je vhodná pro konfiguraci s oběhovým čerpadlem. Prostor hlavy této mikrokolony pojme pět objemů sloupce (které se na začátku pokusu vypustí) a objem pěti vzorků (které se během experimentu odebírají k analýze). Velikost hlavy kolony může být menší, pokud lze během experimentu přidávat do systému vodu k nahrazení původních pěti objemů sloupce eluovaných s nečistotami. Kolona je připojena hadičkami z inertního materiálu k oběhovému čerpadlu, které je schopno zajistit průtok asi 25 ml/h. Oběhovým čerpadlem může být například peristaltické nebo membránové čerpadlo. Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci materiálu hadičky a/nebo adsorpci na něj.

12. Obrázek 3 ukazuje schematické uspořádání při použití vyrovnávací nádoby. V tomto uspořádání je mikrokolona vybavena jednocestným uzavíracím kohoutem. Spojení s vyrovnávací nádobou se skládá ze zabroušeného skleněného spoje a hadičky z inertního materiálu. Průtoková rychlost z vyrovnávací nádoby by měla být přibližně 25 ml/h.

▼**M4**

Obrázek 1



Rozměry v mm

A. připojení pro skleněný zabroušený spoj

B. hlava kolony

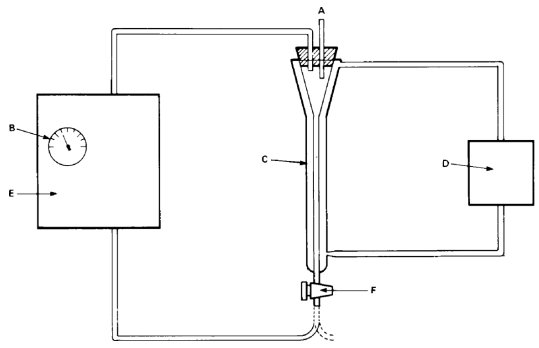
C. vnitřní průměr 5

D. vnější průměr 19

E. smotek skelné vaty

F. uzavírací kohout

Obrázek 2



A. vyrovnání atmosférického tlaku

B. průtokoměr

C. mikrokolona

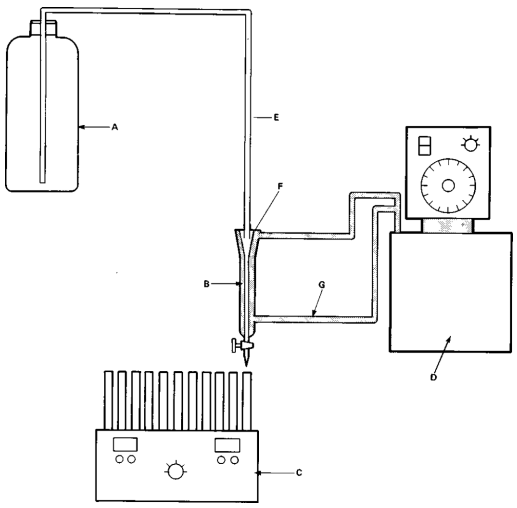
D. termostatované čerpadlo

E. oběhové čerpadlo

F. dvoucestný kohout pro odběr vzorků

▼**M4**

Obrázek 3



A. Vyrovnávací nádoba (např. chemická baňka o objemu 2,5 l)

B. Kolona

C. Sběrač frakcí

D. Termostat

E. Teflonová hadička

F. Skleněný zabroušený spoj

G. Hadice na vodu (mezi termostatem a kolonou, s vnitřním průměrem asi 8 mm)

13. Přibližně 600 mg nosiče se převede do 50 ml baňky s kulatým dnem. Vhodné množství zkoušené chemické látky se rozpustí v těkavém rozpouštědle o jakosti analytického činidla a příslušné množství tohoto roztoku se přidá k nosiči. Rozpouštědlo se zcela odpaří, např. za použití rotační odparky, jinak se nedosáhne úplného nasycení nosiče vodou během elučního kroku v důsledku rozdělování na povrchu nosiče. Nosič s nanesenou látkou se nechá dvě hodiny bobtnat v asi 5 ml vody a poté se suspenze nalije do mikrokolony. Je také možné naplnit mikrokolonu, která byla předtím naplněna vodou, suchým nosičem s nanesenou látkou a poté nechat během dvou hodin ustavit rovnováhu.

14. Nanášení zkoušené chemické látky na nosič může způsobit problémy a vést k chybným výsledkům, např. usazuje-li se zkoušená chemická látka jako olej. Tyto problémy by se měly prozkoumat a zaznamenat příslušné podrobné údaje.

Postup s použitím oběhového čerpadla

15. Zahájí se vymývání kolony. Doporučená rychlost průtoku je asi 25 ml/h, což odpovídá u popsané kolony desetinásobku objemu sloupce za hodinu. Nejméně prvních pět objemů sloupce obsahujících nečistoty rozpustné ve vodě se odstraní. Poté se nechá běžet oběhové čerpadlo až do ustavení rovnováhy, které je dosaženo, neliší-li se koncentrace pěti po sobě následujících vzorků při náhodném výběru o více než ± 30 %, přičemž rozdíly jsou nepravidelné. Tyto vzorky by se měly odebírat v intervalech, během kterých kolonou projde nejméně desetinásobek objemu sloupce. V závislosti na použité analytické metodě může být vhodnější stanovit křivku závislosti koncentrace na čase, aby se prokázalo dosažení rovnováhy.

▼M4

Postup s použitím vyrovnávací nádoby

16. Po sobě následující podíly eluátu se shromažďují a jejich koncentrace se analyzují zvolenou metodou. Pro stanovení rozpustnosti se použijí prostřední frakce eluátu, ve kterých zůstávají koncentrace nejméně v pěti po sobě jdoucích frakcích konstantní v rozmezí ± 30 %.

17. Nejvhodnějším eluentem je dvakrát destilovaná voda. Rovněž lze použít deionizovanou vodu s odporem vyšším než 10 MΩ/cm a s celkovým obsahem organického uhlíku nižším než 0,01 %.

18. V obou postupech se druhé promytí provede při poloviční průtokové rychlosti. Shodují-li se výsledky obou pokusů, považuje se výsledek zkoušky za uspokojivý. Je-li naměřená rozpustnost při nižší průtokové rychlosti vyšší, je nutno pokračovat ve snižování průtoku vždy na polovinu tak dlouho, dokud dvě po sobě následující měření nepovedou k stejné hodnotě rozpustnosti.

19. V obou postupech by se měly frakce otestovat na přítomnost koloidních částic zkouškou Tyndallova jevu. Při přítomnosti částic je výsledek zkoušky neplatný a zkouška by se měla zopakovat po zlepšení filtrační funkce kolony.

20. Mělo by se změřit pH každého vzorku, pokud možno pomocí speciálních indikátorových papírků.

Baňková metoda

Podstata

21. Zkoušená chemická látka (pevné látky musí být ve formě prášku) se rozpustí ve vodě při teplotě, která je o něco vyšší než teplota měření. Po dosažení nasycení se směs ochladí a udržuje se při zkušební teplotě. Jinou možností je provést měření přímo při zkušební teplotě, pokud je vhodným vzorkováním prokázáno, že je dosaženo saturační rovnováhy. Hmotnostní koncentrace zkoušené chemické látky ve vodném roztoku, který nesmí obsahovat žádné nerozpuštěné částice, se následně stanoví vhodnou analytickou metodou (3).

Aparatura

22. Je třeba toto vybavení:

— běžné laboratorní skleněné nádoby a pomůcky,

— zařízení pro třepání roztoků při regulované konstantní teplotě,

— odstředivka (nejlépe termostatovaná), je-li nutná v případě emulzí a

— analytické vybavení.

Postup

23. Množství zkoušené chemické látky potřebné pro nasycení požadovaného objemu vody se odhadne na základě předběžné zkoušky. Do každé ze tří skleněných nádobek opatřených skleněnými zátkami (např. centrifugačních kyvet, baněk) se naváží asi pětinásobek tohoto množství. Dále se do každé z nádobek přidá množství vody zvolené v závislosti na analytické metodě a rozmezí rozpustnosti. Nádobky se těsně uzavřou a poté se jimi třepe při 30 °C. K tomuto účelu by se měla použít třepačka nebo míchačka pracující při konstantní teplotě, např. magnetické míchání v termostatované vodní lázni. Po jednom dni se jedna z nádobek uvede během 24 hodin při zkušební teplotě za občasného protřepání do rovnováhy. Poté se obsah nádobky odstředí při zkušební teplotě a v čiré vodné fázi se vhodnou

▼M4

analytickou metodou stanoví koncentrace zkoušené chemické látky. Po dvou, resp. třech dnech se zbylé dvě baňky po počátečním ustavení rovnováhy při 30 °C zpracují podobným způsobem. Pokud se koncentrace naměřené v nejméně dvou posledních nádobkách neliší o více než 15 %, považuje se výsledek zkoušky za uspokojivý. Pokud hodnoty koncentrací pro nádobky 1, 2 a 3 vykazují stoupající tendenci, mělo by se celé stanovení zopakovat s prodloužením doby pro ustavení rovnováhy.

24. Zkoušku lze provést i bez předběžné inkubace při 30 °C. Aby se zjistila rychlost ustavení saturační rovnováhy, odebírají se vzorky do té doby, dokud doba míchání ovlivňuje měřené koncentrace.

25. Mělo by se změřit pH každého vzorku, pokud možno pomocí speciálních indikátorových papírků.

Analytické stanovení

26. Upřednostňuje se metoda specifická pro danou látku, protože malá množství rozpuštěných nečistot mohou způsobit velké chyby při stanovení rozpustnosti ve vodě. Příklady takových metod jsou plynová nebo kapalinová chromatografie, titrace, fotometrie, voltametrie.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

Sloupcová eluční metoda

27. Pro každý pokus by se měla vypočítat střední hodnota a směrodatná odchylka z nejméně pěti po sobě následujících vzorků vybraných z oblasti po dosažení rovnovážného nasycení. Střední hodnoty získané ze dvou měření při různých průtokových rychlostech by se neměly lišit o více než 30 %.

Baňková metoda

28. Zprůměrují se jednotlivé výsledky pro každou ze tří baněk, které by se neměly lišit o více než 15 %.

Protokol o zkoušce

Sloupcová eluční metoda

29. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— chemickou identitu látky a nečistoty (předběžný purifikační krok, pokud se použije),

— koncentrace, průtokové rychlosti a pH každého vzorku,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky nejméně pro pět vzorků z rovnovážné oblasti křivky nasycení z každého pokusu,

— průměrnou hodnotu nejméně dvou po sobě jdoucích měření,

— teplotu vody během procesu tvorby nasyceného roztoku,

— analytickou metodu,

— druh materiálu nosiče,

— způsob nanesení zkoušené chemické látky na nosič,

— použité rozpouštědlo,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav zkoušené chemické látky.

▼M4

Baňková metoda

30. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— chemickou identitu látky a nečistoty (předběžný purifikační krok, pokud se použije),

— výsledky jednotlivých analytických stanovení a průměrné hodnoty, pokud byla pro každou nádobku stanovena více než jedna hodnota,

— hodnotu pH každého vzorku,

— průměrnou hodnotu pro různé nádobky, jejichž výsledky jsou ve shodě,

— teplotu při zkoušce,

— analytickou metodu,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav zkoušené chemické látky.

LITERATURA:

1) Směrnice Komise 92/69/EHS ze dne 31. července 1992, kterou se po sedmnácté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, Úř. věst. L 383 A, 29.12.1992, s. 54.

2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

1. METODA

Popsaná metoda „třepací lahve“ je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1. ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o disociační konstantě, o rozpustnosti ve vodě, o hydrolýze, o rozpustnosti v n-oktanolu a o povrchovém napětí.

U disociujících látek by měla být měření prováděna pouze s nedisociovanou formou (volná kyselina nebo volná báze), získanou při použití vhodného pufru o pH nejméně o 1 nižším (volná kyselina) nebo vyšším (volná báze) než pK.

Tato zkušební metoda zahrnuje dva samostatné postupy: metodu třepací lahve a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). První metodu lze použít, leží-li hodnota log P_{ow} (definice viz níže) v rozmezí – 2 až 4, a druhou metodu, leží-li hodnota log P_{ow} v rozmezí 0 až 6. Před provedením kteréhokoli z experimentálních postupů by měl být nejdříve získán předběžný odhad rozdělovacího koeficientu.

Metoda třepací lahve je použitelná pouze pro v podstatě čisté látky, které jsou rozpustné ve vodě a v n-oktanolu. Nelze ji použít pro povrchově aktivní látky (pro které by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na příslušných rozpustnostech v n-oktanolu a ve vodě).

Metoda HPLC není použitelná pro silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, povrchově aktivní látky a látky, které reagují s eluentem. Pro tyto látky by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech v n-oktanolu a vodě.

Metoda HPLC je méně citlivá na přítomnost nečistot ve zkoušené látce než metoda třepací lahve. Někdy však mohou nečistoty ztížit interpretaci výsledků, protože přiřazení píků se stává nejistým. U směsí, které dávají nerozlišitelný pás, by měly být uvedeny spodní a horní mez hodnoty log P.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Rozdělovací koeficient (P) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací (c_i) rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému tvořeném dvěma prakticky nemísitelnými rozpouštědly. V případě n-oktanolu a vody platí:

$$p_{ow} = \frac{C_{Oktan-1-ol}}{C_{voda}}$$

Rozdělovací koeficient (P) je tedy podílem dvou koncentrací a udává se obvykle ve formě svého dekadického logaritmu (log P).

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Metoda třepací lahve

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Metoda HPLC

Za účelem korelace hodnot naměřených pro danou sloučeninu metodou HPLC s její hodnotou P je nutné sestrojit kalibrační graf závislosti log P na chromatografických datech tvořený nejméně šesti referenčními body. Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Pokud je to možné, měla by mít alespoň jedna referenční látka P_{ow} vyšší než zkoušená látka a jiná referenční látka P_{ow} nižší než zkoušená látka. U hodnot log P nižších než 4 může být kalibrace založena na datech získaných metodou třepací lahve. U hodnot log P vyšších než 4 může být kalibrace založena na ověřených hodnotách z literatury, pokud jsou v souladu s vypočtenými hodnotami. Za účelem dosažení vyšší přesnosti je vhodnější volit látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka.

Rozsáhlé seznamy hodnot P_{ow} pro mnoho skupin chemických látek jsou dostupné v literatuře (2, 3). Nejsou-li k dispozici údaje o rozdělovacích koeficientech látek s podobnou strukturou, lze použít obecnější kalibraci s jinými referenčními látkami.

Seznam doporučených referenčních látek a jejich hodnot P_{ow} je uveden v doplňku 2..

1.4 PODSTATA METODY

1.4.1 **Metoda třepací lahve**

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu musí být dosaženo rovnováhy mezi všemi vzájemně působícími složkami systému a musí být stanoveny koncentrace látek rozpuštěných v obou fázích. Ze studia literatury vztahující se k této otázce vyplývá, že k řešení tohoto problému lze použít několik různých postupů, např. důkladné promíchání obou fází a jejich následné oddělení za účelem stanovení rovnovážných koncentraci vyšetřované látky.

1.4.2 **Metoda HPLC**

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např.. C_8, C_{18}) chemicky vázané na oxid křemičitý. Chemické látky nastříknuté do této kolony se v ní pohybují různou rychlostí v důsledku různých stupňů rozdělení mezi mobilní fázi a uhlovodíkovou stacionární fázi. Směsi chemikálií se eluují v pořadí své hydrofobnosti, přičemž se látky rozpustné ve vodě eluují jako první a látky rozpustné v olejích jako poslední, úměrně svému rozdělovacímu koeficientu uhlovodíky-voda. To umožňuje určit vztah mezi retenčním časem v této koloně (s reversními fázemi) a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda. Rozdělovací koeficient se odvodí z kapacitního faktoru k, daného výrazem:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

v němž, t_r = retenční čas zkoušené látky, t_o = průměrná doba, kterou molekula rozpouštědla potřebuje k průchodu kolonou (mrtvá doba).

Kvantitativní analytické metody nejsou zapotřebí, nezbytné je pouze stanovení elučních dob.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Metoda třepací lahve

S cílem zaručit správnost hodnoty rozdělovacího koeficientu se provedou opakovaná stanovení při třech různých zkušebních podmínkách, přičemž lze měnit jak množství dané látky, tak poměr objemů obou rozpouštědel. Dekadické logaritmy stanovených hodnot rozdělovacího koeficientu by měly ležet v rozmezí ± 0,3.

Metoda HPLC

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena opakovaná stanovení. Hodnoty log P získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,1.

1.5.2. **Citlivost**

Metoda třepací lahve

Měřicí rozsah metody je určen mezí detekce analytické metody. Ta by měla umožnit stanovení hodnot log P_{ow} v oblasti od - 2 do 4 (pokud to podmínky dovolí, lze tuto oblast rozšířit až do hodnoty log P_{ow} do 5) není-li koncentrace rozpuštěné látky v žádné z fází vyšší než 0,01 mol/l.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umožňuje stanovení rozdělovacích koeficientů v rozsahu log P_{ow} od 0 do 6.

Obvykle je možné určit rozdělovací koeficient dané látky s přesností ± 1 řádu vzhledem k hodnotě získané metodou třepací lahve. Typické korelace lze nalézt v literatuře (4, 5, 6, 7, 8). Vyšší přesnosti lze obvykle dosáhnout, je-li korelační závislost založena na referenčních látkách podobné struktury (9).

▼B

1.5.3 **Specifičnost**

Metoda třepací lahve

Nernstův rozdělovací zákon platí pro zředěné roztoky jen při konstantní teplotě, konstantním tlaku a pH. Platí pouze pro čistou látku rozdělenou mezi dvě čistá rozpouštědla. Je-li současně v jedné nebo obou fázích přítomno více rozpuštěných látek, může tím být výsledek ovlivněn.

Disociace nebo asociace rozpuštěných molekul vede k odchylkám od Nernstova rozdělovacího zákona. Tyto odchylky se projevují tím, že se rozdělovací koeficient stává závislým na koncentraci roztoku.

V důsledku existujících mnohonásobných rozdělovacích rovnovah by tato metoda neměla být použita bez korekcí na disociovatelné sloučeniny. Pro tyto sloučeniny by mělo být zváženo použití pufračních roztoků namísto vody; pH pufračního roztoku by se mělo lišit od pK_a látky nejméně o 1, přičemž se zohlední význam tohoto pH s ohledem na životní prostředí.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu**

Hodnotu rozdělovacího koeficientu lze nejlépe odhadnout na základě výpočtu (viz doplněk 1) nebo popřípadě z poměru rozpustností zkoušené látky v čistých rozpouštědlech (10).

1.6.2 **Metoda třepací lahve**

1.6.2.1 *Příprava*

n-oktanol: stanovení rozdělovacího koeficientu by mělo být provedeno s n-oktanolem čistoty p.a.

Voda: měla by být použita destilovaná voda nebo redestilovaná voda ve skleněné nebo křemenné aparatuře. V případě potřeby by měly být u disociovatelných látek použity místo vody pufrační roztoky.

Poznámka:

Neměla by být použita voda pocházející přímo z měniče iontů.

1.6.2.1.1 Předběžné nasycení rozpouštědel

Před stanovením rozdělovacího koeficientu se fáze rozpouštědlového systému vzájemně nasytí třepáním při teplotě experimentu. K dosažení tohoto cíle je vhodné 24 hodin třepat na mechanické třepačce ve dvou velkých zásobních lahvích vysoce čistý n-oktanol nebo vysoce čistou vodu, obojí s dostatečným množstvím druhého rozpouštědla, a poté nechat rozpouštědla stát tak dlouho, dokud se obě fáze neoddělí a dokud není dosaženo nasycení.

▼B

1.6.2.1.2 Příprava zkoušky

Celkový objem dvoufázového systému by měl téměř naplňovat zkušební nádobu. Tím se zamezí ztrátám látek v důsledku odpařování. Poměry objemů a množství látek, které mají být použity, jsou dány:

— předběžným odhadem rozdělovacího koeficientu (viz výše),

— minimálním množstvím zkoušené látky nezbytným pro postup analýzy a

— omezením maximální koncentrace v každé fázi na 0,01 mol/l.

Provedou se tři zkoušky. Při první se použije vypočtený poměr objemů n-oktanolu a vody; při druhé se tento poměr dělí dvěma a při třetí se tento poměr násobí dvěma (např. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Zkoušená látka

Připraví se zásobní roztok v n-oktanolu předem nasyceném vodou. Koncentrace tohoto zásobního roztoku by měla být před jeho použitím ke stanovení rozdělovacího koeficientu přesně stanovena. Tento roztok by měl být uchováván za podmínek, které zajistí jeho stálost.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkušební teplota by měla být konstantní (±1 °C) a měla by ležet v rozmezí 20–25 °C.

1.6.2.3 *Postup měření*

1.6.2.3.1 Ustavení rovnováhy rozdělení

Pro každou ze zkušebních podmínek by měly být připraveny dvě zkušební nádoby obsahující potřebná přesně odměřená množství obou rozpouštědel spolu s nezbytným množstvím zásobního roztoku.

Fáze n-oktanolu je nutné odměřit objemově. Zkušební nádoby by měly být umístěny do vhodné třepačky, nebo by měly být třepány ručně. Při použití centrifugační kyvety spočívá doporučený postup v tom, že se kyveta rychle otáčí kolem své příčné osy o 180°, takže případný zachycený vzduch stoupá vzhůru oběma fázemi. Ze zkušenosti vyplývá, že k ustavení rovnovážného rozdělení obvykle stačí 50 takových otočení. Pro jistotu se doporučuje 100 otočení během pěti minut.

1.6.2.3.2 Oddělení fází

V případě potřeby lze oddělení fází provést odstředěním směsi. Odstředění by mělo být provedeno laboratorní odstředivkou udržovanou při laboratorní teplotě, nebo, je-li použita odstředivka bez regulace teploty, by měly být centrifugační kyvety za účelem ustavení rovnováhy udržovány alespoň jednu hodinu před analýzou při zkušební teplotě.

▼B

1.6.2.4 *Analýza*

Za účelem stanovení rozdělovacího koeficientu je nutné stanovit koncentrace zkoušené látky v obou fázích. To lze provést odebráním alikvotního podílu každé z obou fází z každé kyvety a pro každou zkušební podmínku a jejich analýzou zvoleným postupem. Celkové množství látky přítomné v obou fázích by mělo být vypočteno a porovnáno s původně dodaným množstvím látky.

Odběr vzorku z vodné fáze je nutné provést postupem minimalizujícím riziko znečištění stopami n-oktanolu: k odběru vzorků vodné fáze lze použít skleněnou injekční stříkačku s vyměnitelnou jehlou. Stříkačka se nejprve částečně naplní vzduchem. Vzduch se při průchodu jehly vrstvou n-oktanolu opatrně vypudí. Do stříkačky se natáhne dostatečný objem vodné fáze. Obsah stříkačky lze poté použít jako vzorek vodné fáze. Stříkačka se z roztoku rychle vytáhne a jehla se sejme. Koncentrace v obou od sebe oddělených fázích by měla být stanovena nejlépe metodou, která je specifická pro danou látku. Příklady možných vhodných analytických metod jsou:

— fotometrické metody,

— plynová chromatografie,

— vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

1.6.3 **Metoda HPLC**

1.6.3.1 *Příprava*

Aparatura

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovacími smyčkami. Přítomnost polárních skupin ve stacionární fázi může závažně zhoršit účinnost kolony HPLC. Stacionární fáze by proto měla mít minimální podíl polárních skupin (11). Lze použít komerční mikročásticové náplně s reversními fázemi nebo hotové kolony s náplní. Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona.

Mobilní fáze

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol čistoty pro HPLC a voda čistoty pro HPLC, které se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Doporučuje se použít směsi methanol-voda s minimálním obsahem vody 25 %. Obvykle vyhovuje pro eluci sloučenin o log P = 6 během jedné hodiny při průtokové rychlosti 1 ml/min směs methanol-voda 3:1 (obj.). U sloučenin s vysokou hodnotou log P může být nutné zkrátit eluční dobu (stejně tak u referenčních látek) snížením polarity mobilní fáze nebo délky kolony.

Látky s velmi nízkou rozpustností v n-oktanolu mají tendenci při použití metody HPLC vykazovat abnormálně nízké hodnoty P_{ow}; píky těchto sloučenin někdy doprovázejí čelo rozpouštědla. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že proces rozdělení je příliš pomalý, než aby bylo dosaženo rovnováhy za dobu, po kterou obvykle trvá dělení metodou HPLC. Pro dosažení spolehlivé hodnoty může být v takovém případě účinné snížení průtokové rychlosti nebo snížení poměru methanol-voda.

▼B

Zkoušená i referenční látka by měly být rozpustné v mobilní fázi v dostatečných koncentracích umožňujících jejich detekci. Pouze ve výjimečných případech mohou být u směsi methanol-voda použita aditiva, neboť aditiva mění vlastnosti kolony. V případě chromatogramů získaných při použití aditiv, musí být použita samostatná kolona téhož typu. Nevyhovuje-li směs methanol-voda, lze použít směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. ethanol-voda nebo acetonitril-voda.

Pro disociovatelné látky je kritické pH eluentu. Mělo by ležet v pracovní oblasti pH kolony, která je obvykle 2 až 8. Doporučuje se použití pufračních roztoků. Je nezbytné dbát na to, aby nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufračním roztokem. Měření pomocí HPLC se stacionárními fázemi na bázi oxidu křemičitého při pH vyšším než 8 se nedoporučuje, neboť použití alkalické mobilní fáze může způsobit rychlé narušení činnosti kolony.

Rozpouštěné látky

Referenční sloučeniny by měly mít nejvyšší dostupnou čistotu. Sloučeniny, které se mají používat pro zkoušení nebo kalibraci, se pokud možno rozpustí v mobilní fázi.

Zkušební podmínky

Teplota by během měření neměla kolísat o více než ± 2 K.

1.6.3.2 ***Měření***

Výpočet mrtvé doby t_o

Mrtvou dobu t_o je možné stanovit buď pomocí homologické řady (např. nalkylmethylketonů) nebo nezadržovaných organických sloučenin (např. thiomočoviny nebo formamidu). Pro výpočet mrtvé doby t_o s použitím homologické řady se nastříkne sada alespoň sedmi členů homologické řady a stanoví se příslušné retenční časy. Neupravené retenční časy t_r (n_c + 1) se vynesou jako funkce $t_r(n_c)$ a stanoví se absolutní člen a a směrnice b regresní rovnice:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + bt_{r(n_c)}$$

(n_c = počet atomů uhlíku). Mrtvá doba t_o je dána vztahem:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Kalibrační křivka

Následujícím krokem je sestrojení korelační závislosti hodnot log k na log P pro příslušné referenční sloučeniny. V praxi se současně nastříkne soubor 5 až 10 standardních referenčních sloučenin, jejichž log P leží v očekávané oblasti, a stanoví se retenční časy, nejlépe zapisovacím integrátorem napojeným na detekční systém. Vypočtou se příslušné logaritmy kapacitních faktorů, log k, a vynesou se jako funkce hodnot log P stanovených metodou třepací lahve. Kalibrace se provádí v pravidelných intervalech nejméně jednou denně, aby bylo možné zohlednit případné změny činnosti kolony.

Stanovení kapacitního faktoru zkoušeně látky

Zkoušená látka se nastříkne v co nejmenším množství mobilní fáze. Stanoví se retenční čas (dvakrát), umožňující výpočet kapacitního faktoru k. Z korelační křivky referenčních sloučenin je možné interpolací získat rozdělovací koeficient zkoušené látky. U velmi nízkých a velmi vysokých rozdělovacích koeficientů je nutná extrapolace. V těchto případech je nutno věnovat zvláštní pozornost intervalům spolehlivosti regresní křivky.

2. **DATA**

Metoda třepací lahve

Spolehlivost stanovených hodnot P je možné prověřit srovnáním středních hodnot z opakovaných stanovení s celkovou střední hodnotou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty)

— nejsou-li metody použitelné (např. u povrchově aktivní látky), měla by být uvedena vypočtená hodnota nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech látky v n-oktanolu a ve vodě,

— všechny informace a poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

Pro metodu třepací lahve:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— teplotu stanovení,

— údaje o analytických postupech použitých ke stanovení koncentrací,

— dobu a rychlost odstřeďování, pokud se použilo,

▼B

— koncentrace naměřené při každém stanovení v obou fázích (tzn. uvede se celkem 12 koncentrací),

— hmotnost zkoušené látky, objem každé fáze použité v každé zkušební nádobě a vypočtené celkové množství zkoušené látky, obsažené v jednotlivých fázích po dosažení rovnováhy,

— vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu (P) a střední hodnotu je nutné uvést pro každý soubor zkušebních podmínek, stejně tak střední hodnotu ze všech stanovení. Pokud existují náznaky závislosti rozdělovacího koeficientu na koncentraci, mělo by to být uvedeno ve zprávě,

— měla by být uvedena směrodatná odchylka jednotlivých hodnot P od střední hodnoty,

— měl by být také uveden dekadický logaritmus střední hodnoty P ze všech stanovení,

— vypočtená teoretická hodnota P_{ow} byla-li stanovena nebo je-li naměřená hodnota > 10^4,

— pH použité vody a vodné fáze během experimentu,

— pokud byly použity pufry, zdůvodnění jejich použití místo vody, jejich složení, koncentrace a pH, pH vodné fáze před a po experimentu.

Pro metodu HPLC:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— zkoušená látka a referenční látky, jejich čistota,

— teplotní rozmezí při stanoveních,

— pH, při kterém se prováděla stanovení,

— podrobnosti o analytické a ochranné koloně, o mobilní fázi a o způsobu detekce

— retenční data a hodnoty log P z literatury pro referenční sloučeniny použité ke kalibraci,

— podrobnosti o proložené regresní přímce (log k versus log P),

— průměrná retenční data a interpolovaná hodnota log P pro zkušební sloučeninu,

— popis zařízení a pracovních podmínek,

— eluční křivky,

— množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,

— mrtvý čas a způsob jeho měření.

▼B

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) -Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat, 1984, vol. 7, 675.

9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.

11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical prqducts for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual, 1981, vol. 10, 382.

20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von WirkstofFen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Doplněk 1

Metody výpočtu nebo odhadu

ÚVOD

Obecný úvod do výpočtových metod, data a příklady jsou uvedeny v příručce Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Vypočtené hodnoty $P_{o/v}$ lze použít:

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná (rozsah u třepací lahve: log $P_{o/v}$: –2 až 4, rozsah u HPLC: log $P_{o/v}$: 0 až 6),

— k volbě vhodných zkušebních podmínek (např. referenčních látek pro postupy HPLC, poměr objemů n-oktanol/voda pro metodu třepací lahve),

— jako vnitřní laboratorní kontrolu možných experimentálních chyb,

— k získání odhadu $P_{o/v}$ případech, kdy zkušební metody nelze z technických důvodů použít.

METODA ODHADU

Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu

Hodnotu rozdělovacího koeficientu je možné odhadnout s použitím rozpustnosti zkoušené látky v čistých rozpouštědlech:

$$P_{odhad} = \frac{\text{nasycení}_{\text{oktan-1-ol}}}{\text{nasycení}_{\text{voda}}}$$

VÝPOČTOVÉ METODY

Podstata výpočtových metod

Všechny výpočtové metody jsou založeny na formálním dělení molekul do vhodných podstruktur, pro něž jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků log $P_{o/v}$.Hodnota log $P_{o/v}$ celé molekuly se poté vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty plus součet korekčních členů pro intramolekulární interakce.

Existují seznamy konstant fragmentů a korekčních členů (b, c, d, e). Některé se pravidelně aktualizují (b).

Kritéria jakosti

Spolehlivost výpočtové metody obecně klesá s rostoucí složitostí zkoumané sloučeniny. V případě jednoduchých molekul s nízkou molekulovou hmotností a jednou nebo dvěma funkčními skupinami lze očekávat, že odchylky hodnot log $P_{o/v}$ získaných různými fragmentačními metodami od naměřené hodnoty budou v rozmezí od 0,1 do 0,3. U složitějších molekul může být rozpětí chyby větší. Závisí to na spolehlivosti a dostupnosti konstant pro fragmenty a rovněž na schopnosti zjistit intramolekulární interakce (např. vodíkové vazby) a na správném používání korekčních členů (což není obtížné při použití počítačového programu CLOGP-3) (b). V případě disociujících látek je důležité správně zohlednit náboj nebo stupeň disociace.

▼B

Postupy výpočtu

Hanschova π-metoda

Původní konstanta hydrofobnosti substituentu *n,* zavedená Fujitou et al. (f) je definována jako

$\pi_x = \log P_{o/v}$ (PhX) - log $P_{o/v}$ (PhH)

kde $P_{o/v}$ (PhX) je rozdělovací koeficient aromatického derivátu a $P_{o/v}$ (PhH) rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny

(např. $\pi_{Cl} = \log P_{o/v}$ (C_6H_5Cl) - log $P_{o/v}$ (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).

rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny Ze své definice je π-metoda použitelná především u aromatických substituentů. Hodnoty π byly pro velký počet substituentů uspořádány do tabulek (b, c, d). Používají se k výpočtu log $P_{o/v}$ aromatických molekul nebo substruktur.

Rekkerova metoda

Podle Rekkera (g) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte takto:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interakční člen})$$

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů a a_i četnost jejich výskytu ve vyšetřované molekule. Korekční členy je možné vyjádřit jako souhrnný násobek jediné konstanty C_m (tzv. „magické konstanty“). Konstanty pro molekulární fragmenty f_i a C_m byly stanoveny ze seznamu 1 054 experimentálních hodnot $P_{o/v}$ (pro 825 sloučenin) pomocí vícenásobné regresní analýzy (c, h). Interakční členy se určí podle stanovených pravidel popsaných v literatuře (e, h, i).

Hanschova-Leova metoda

Podle Hansche a Lea (c) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte z výrazu:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů, F_j korekční členy a_i, b_j odpovídající četnosti výskytů. Na základě experimentálních hodnot $P_{o/v}$ byl pokusně sestaven seznam hodnot pro atomové a skupinové fragmenty a seznam korekčních členů F_j (tzv. „faktorů“). Korekční členy byly setříděny do několika různých tříd (a, c). Zohlednění všech pravidel a korekčních členů je poměrně složité a časově náročné. Byly vyvinuty sady softwaru (b).

Kombinovaná metoda

Výpočet log $P_{o/v}$ složitých molekul lze značně zdokonalit, jestliže se molekula rozdělí do větších podstruktur, pro něž existují spolehlivé hodnoty pocházející buď z tabulek (b, c), nebo z vlastních měření. Tyto fragmenty (např. heterocykly, antrachinon, azobenzen) lze poté kombinovat s Hanschovými π-hodnotami nebo s Rekkerovými nebo Leovými konstantami pro fragmenty.

Poznámky

i) Výpočetní metody lze použít pro částečně nebo úplně disociované sloučeniny pouze tehdy, lze-li vzít v úvahu nezbytné korekční faktory.

▼B

ii) Pokud lze předpokládat přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb, je nutné přičíst odpovídající korekční členy (přibližně 0,6 až 1,0 logaritmu hodnot $P_{o/v}$) (a). O přítomnosti těchto vazeb lze usuzovat z prostorových modelů nebo ze spektroskopických dat molekuly.

iii) Může-li existovat několik tautomerních forem, měla by být jako základ pro výpočet použita nejpravděpodobnější forma.

iv) Pečlivě by měly být sledovány přepracované seznamy konstant fragmentů.

Protokol o zkoušce

Při použití výpočtové metody nebo metody odhadu by měl protokol o zkoušce pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis látky (směs, nečistoty atd.),

— známky přítomnosti intramolekulárních vodíkových vazeb, disociace, nábojů a dalších neobvyklých efektů (např. tautomerie),

— popis výpočtové metody,

— označení nebo uvedení databáze,

— zvláštnosti při volbě fragmentů,

— vyčerpávající dokumentaci výpočtů.

LITERATURA

a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977,vol 1.

h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Doplněk 2

Doporučené referenční látky pro metodu HPLC

Číslo	referenční látka	log P_{ow}	pKa
1	butan2on	0,3	
2	4acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	4chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitroben	1,9	
18	3fenylpropan2ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	pkresol	1,9	pKa = 10,17
21	kyselina skořicová	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoát	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kyselina 3mehylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	4chlorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlorbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3chlorbenzoová	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	naftalenlol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allyfenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	

▼B

Číslo	referenční látka	log P_{ow}	pKa
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	l,4dichlorbenzen	3,4	
43	difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6trichlorfenol	3,7	pKa = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6selebutylfenol	4,1	
51	l,2,4trichlorbenzen	4,2	
52	kyselina dodekanová	4,2	
53	difenylether	4,2	
54	nbutylbenzcn	4,5	
55	fenanthren	4,5	
56	fluoranthen	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyrídin	4,9	
59	trifenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Jiné referenční látkys nízkou hodnotou log P_{ow}		
1	kyselina nikotinová	- 0,7	

▼B

A.9 BOD VZPLANUTÍ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o hořlavosti látky. Zkušební postup je použitelný pro kapaliny, jejichž páry lze zapálit zdroji zapálení. Zkušební metody uvedené v tomto textu jsou spolehlivé pouze v rozsahu bodu vzplanutí, který je specifikován v jednotlivých metodách.

Při výběru metody, která má být použita, by mělo být zváženo, zda nemůže dojít k chemických reakcím mezi látkou a zkušebním kelímkem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod vzplanutí je nejnižší teplota přepočtená k tlaku 101,325 kPa, při které kapalina uvolňuje za podmínek definovaných ve zkušební metodě páry v takovém množství, že se z nich ve zkušební nádobce vytvoří hořlavá směs se vzduchem.

Jednotky teploty: °C

$t = T - 273{,}15$

(t je ve °C a T je v K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se vpraví do zkušební nádobky, ve které je zahřívána nebo chlazena na zkušební teplotu podle postupu popsaného v dané zkušební metodě. Zkoušky vzplanutí se provádějí za účelem zjištění, zda vzorek vzplane či nevzplane při zkušební teplotě.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodu vzplanutí a použité zkušební metodě; maximální tolerance je 2 °C.

1.5.2 **Citlivost**

Citlivost závisí na použité zkušební metodě.

1.5.3 **Specifičnost**

Specifičnost některých metod je omezena na určitý rozsah bodu vzplanutí a závisí na vlastnostech látky (např. na vysoké viskozitě).

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Vzorek zkoušené látky se vloží do zkušebního zařízení podle bodů 1.6.3.1 a/nebo 1.6.3.2.

Kvůli bezpečnosti se doporučuje, aby byla v případě toxických látek nebo látek s vysokým energetickým potenciálem použita metoda, při níž se pracuje s malým množství vzorku, přibližně 2 cm.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Je-li to v souladu s podmínkami bezpečnosti, umístí se zkušební zařízení na místo, kde nedochází k nadměrnému proudění vzduchu.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

1.6.3.1 *Rovnovážná metoda*

Viz ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Nerovnovážná metoda*

Zkušební zařízení podle Abela:

Viz BS 2000 – část 170, NF M07-011, NF T66-009.

Zkušební zařízení podle Abela-Penskyho:

Viz EN 57, DIN 51755 – část 1 (pro teploty od 5 do 65 °C), DIN 51755 – část 2 (pro teploty pod 5 °C), NF M07-036.

Zkušební zařízení TAG:

Viz ASTM D 56.

Zkušební zařízení podle Penskyho-Martense:

Viz ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 a NF M 07-019.

Poznámky:

Pokud se hodnota bodu vzplanutí stanovená nerovnovážnou metodou podle bodu 1.6.3.2 nachází v rozmezí 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C nebo 55 ± 2 °C, měla by být potvrzena rovnovážnou metodou pomocí stejného zkušebního zařízení.

Pro oznámení mohou být použity pouze ty metody, kterými lze bod vzplanutí stanovit.

Ke stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin obsahujících rozpouštědla (barvy, lepidla apod.) mohou být použity pouze zkušební zařízení a zkušební metody vhodné pro stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin.

Viz ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 a DIN 53213 – část 1.

▼B

2. **DATA**

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— odkaz na použitou metodu a na všechny případné odchylky,

— výsledky a všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

▼B

A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška by měla být použita pouze pro práškové, zrnité nebo pastovité látky.

Aby se mezi vysoce hořlavé látky nezahrnovaly všechny látky, které lze zapálit, nýbrž pouze ty, které hoří rychle nebo jejichž chování je při hoření nějakým způsobem zvláště nebezpečné, jsou za vysoce hořlavé považovány jen ty látky, u nichž rychlost hoření překročí určitou mezní hodnotu.

Zvláště nebezpečné může být hoření doutnáním, šíří-li se kovovým prachem, a to pro jeho obtížné hašení. Kovové prachy se považují za vysoce hořlavé, pokud podporují šíření doutnáním celou hmotou za specifikovanou dobu.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření se vyjadřuje v sekundách.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm a provede se předběžná screeningová zkouška s cílem stanovit, zda nastane po zapálení plamenem plynového hořáku šíření plamenem nebo doutnáním. Pokud se hoření za předepsanou dobu rozšíří na více než 200 mm délky prachové housenky, provede se úplná zkouška pro stanovení rychlosti hoření.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžná screeningová zkouška**

Látka se na nehořlavé, neporézní a málo tepelně vodivé podkladové desce zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm, šířce 20 mm a výšce 10 mm. Na jeden konec prachové housenky se působí plamenem plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm), dokud se prach nevznítí, nebo maximálně 2 minuty (5 minut u prachů kovů nebo kovových slitin). Zjišťuje se, zda se hoření rozšíří na 200 mm délky prachové housenky v průběhu zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů). Jestliže se látka nevznítí a hoření se buď plamenem, nebo doutnáním nerozšíří na 200 mm délky prachové housenky do zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), nepovažuje se látka za vysoce hořlavou a další zkouška se nepožaduje. Jestliže se látka zapálí a hoření se rozšíří plamenem na 200 mm délky prachové housenky za zkušební dobu méně než 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), provede se postup uvedený níže (bod 1.6.2 dále).

1.6.2 **Zkouška rychlosti hoření**

1.6.2.1 *Příprava*

Práškovité nebo zrnité látky se volně nasypou do formy s trojúhelníkovým příčným průřezem o délce 250 mm o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní 2 kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se poté třikrát spustí z výšky 2 cm na pevný povrch. Podle potřeby se forma doplní. Bočnice se sejmou a přebytek látky se seškrábne. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma se odstraní.

Pastovité látky se rozetřou na nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou desku do tvaru provazce o délce 250 mm a příčném průřezu přibližně 1 cm.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

V případě látky, která je citlivá na vlhkost, se zkouška provede co nejrychleji po vyjmutí látky z nádoby.

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Zformovaný vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení se postaví ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

K zapálení zformovaného zkoušeného vzorku na jeho jednom konci se použije plamen plynového hořáku o průměru minimálně 5 mm. Po vyhoření 80 mm délky zformovaného zkoušeného vzorku se měří rychlost hoření na dalších 100 mm.

▼B

Zkouška se provede šestkrát, vždy s pomocí čisté a vychladlé desky, pokud není pozorován pozitivní výsledek dříve.

2. **DATA**

Pro vyhodnocení jsou důležité doba hoření z předběžné screeningové zkoušky (1.6.1) a nejkratší doba hoření ze šesti zkoušek (1.6.2.3).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis zkoušené látky, její fyzikální stav, včetně obsahu vlhkosti,

— výsledky předběžné screeningové zkoušky a zkoušky rychlosti hoření, je-li provedena,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Práškovité, zrnité nebo pastovité látky se považují za vysoce hořlavé, je-li doba hoření v každé zkoušce provedené podle zkušebního postupu popsaného v bodě 1.6.2 menší než 45 sekund. Prach kovů nebo kovových slitin se považuje za vysoce hořlavý, pokud jej lze zapálit a plamen nebo reakční zóna se rozšíří po celém zkoušeném vzorku za 10 minut nebo za kratší dobu.

4. **LITERATURA**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

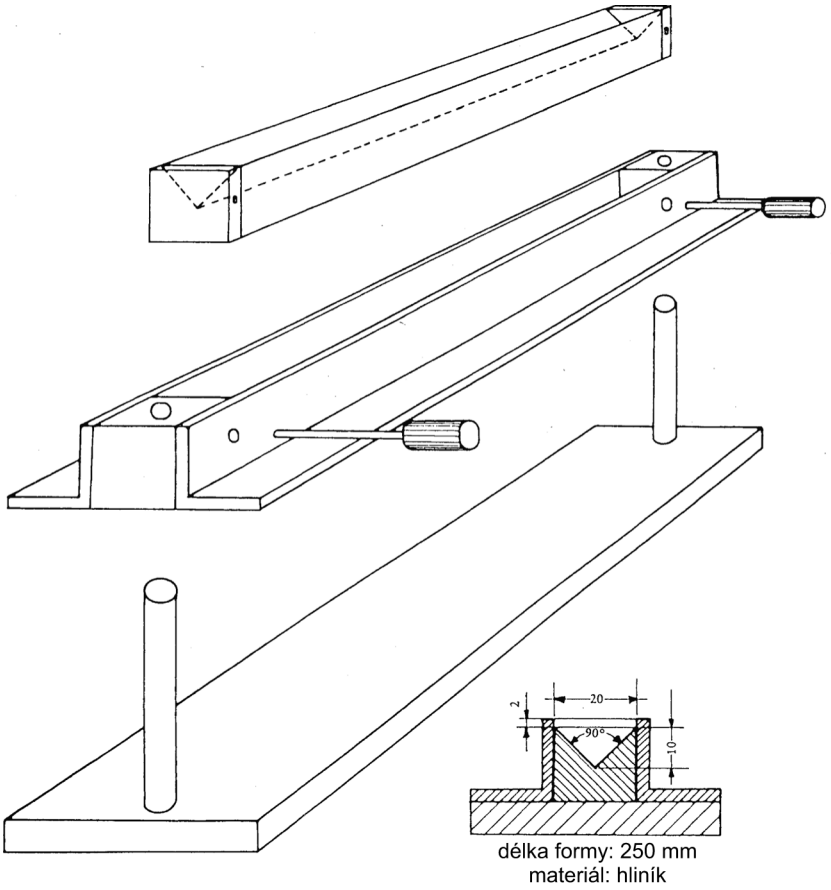
▼B

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku

(Všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼B

A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda jsou plyny ve směsi se vzduchem při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku hořlavé, a jsou-li hořlavé, v jakém rozmezí koncentrací. Směsi se vzduchem, u nichž se postupně zvyšuje koncentrace zkušebního plynu, jsou zapalovány elektrickou jiskrou a sleduje se, zda dojde k zapálení.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Oblast hořlavosti je rozpětí koncentrace mezi dolní a horní mezí výbušnosti. Dolní a horní meze výbušnosti jsou takové mezní koncentrace hořlavého plynu ve směsi se vzduchem, za nimiž nedojde k šíření plamene.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Koncentrace plynu ve vzduchu je postupně zvyšována a v každém stupni se směs zapaluje elektrickou jiskrou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6. POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Zkušební nádobu tvoří svislý skleněný válec s vnitřním průměrem nejméně 50 mm a výškou nejméně 300 mm. Zapalovací elektrody jsou od sebe vzdáleny 3 až 5 mm a jsou umístěny ve výšce 60 mm nad dnem válce. Válec je opatřen přetlakovou bezpečnostní pojistkou. Aparatura musí být opatřena krytem, aby se zamezilo jakémukoli poškození výbuchem.

Jako zdroj zapálení se používá statický indukční výboj trvající 0,5 sekundy generovaný vysokonapěťovým transformátorem o výstupním napětí od 10 kV do 15 kV (maximální příkon je 300 W). Příklad vhodné aparatury je popsán v literatuře (2).

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Zkouška musí být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

▼B

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Pomocí dávkovacích čerpadel se do skleněného válce vhání směs plynu se vzduchem o známé koncentraci. Vyvolá se jiskra a sleduje se, zda se plamen oddělí od zdroje zapálení a zda se samovolně šíří. Koncentrace plynu se postupně zvyšuje o 1 %, dokud nedojde k výše popsanému zapálení.

Jestliže z chemické struktury plynu vyplývá, že by mohl být nehořlavý, a lze-li vypočítat stechiometrické složení směsi se vzduchem, postačuje zkoušet směsi pouze v rozmezí od koncentrace o 10 % nižší, než je stechiometrické složení, do koncentrace o 10 % vyšší, než je stechiometrické složení, a to postupně po 1 %.

2. **DATA**

Výskyt šíření plamene je jediná relevantní informace pro stanovení této vlastnosti.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis použité aparatury s rozměry,

— teplota, při které byla zkouška provedena,

— zkušební koncentrace a získané výsledky,

— výsledek zkoušky: nehořlavý plyn nebo vysoce hořlavý plyn,

— jestliže byl učiněn závěr, že je plyn nehořlavý, uvede se koncentrační rozpětí, které bylo zkoušeno v krocích po 1 %,

— musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126–127. Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung.

▼B

A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tuto zkušební metodu lze použít pro zjištění, zda reakce látky s vodou nebo vzdušnou vlhkostí vede k vývinu nebezpečného množství plynu nebo plynů, které mohou být vysoce hořlavé.

Tuto zkušební metodu lze použít pro pevné látky a pro kapaliny. Nelze ji použít pro látky, které se spontánně vznítí ve styku se vzduchem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Vysoce hořlavé látky: látky, které při kontaktu s vodou nebo vzdušnou vlhkostí uvolňují vysoce hořlavé plyny v nebezpečném množství rychlostí nejméně 1 litr na kg látky za hodinu.

1.3 PODSTATA METODY

Látka je zkoušena postupně, jak je uvedeno níže; dojde-li v některém stupni ke vznícení, není další zkoušení potřebné. Je-li známo, že látka s vodou nereaguje prudce, pokračuje se čtvrtým stupněm (bod 1.3.4).

1.3.1 **Stupeň 1**

Zkoušená látka se vnese do vaničky s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.2 **Stupeň 2**

Zkoušená látka se položí na filtrační papír plovoucí v misce s destilovanou vodou o teplotě 20 °C na vodní hladině a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli. Filtrační papír slouží pouze k tomu, aby byla látka položena na jedno místo a tím se zvýšila možnost vznícení.

1.3.3 **Stupeň 3**

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm. Přidá se do ní několik kapek vody a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.4 **Stupeň 4**

Zkoušená látka se smíchá s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a v jednohodinových intervalech se měří rychlost vývinu plynu po dobu 7 hodin. Je-li po sedmi hodinách rychlost vývinu plynu nepravidelná nebo narůstá, doba měření by se měla prodloužit na maximálně pět dnů. Zkoušku lze přerušit, jestliže rychlost vývinu plynu v průběhu měření převýší 1 litr na kg látky za hodinu.

▼B

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Stupeň 1**

1.6.1.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.1.2 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se vnese do misky s destilovanou vodou. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.2 **Stupeň 2**

1.6.2.1 *Aparatura*

Ve vhodné nádobě, např. v odpařovací misce o průměru přibližně 100 mm se na hladinu destilované vody umístí filtrační papír.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se umístí do středu filtračního papíru. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.3 **Stupeň 3**

1.6.3.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.3.2 *Provedení zkoušky*

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm s jamkou v horní části. Do jamky se přidá několik kapek vody a sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

▼B

1.6.4 **Stupeň 4**

1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestaví způsobem uvedeným na obrázku.

1.6.4.2 *Zkušební podmínky*

Nádoba se zkoušenou látkou se prohlédne, zda neobsahuje prach o velikosti částic < 500 um. Tvoří-li prach více než 1 % hmot. celkového množství nebo drobí-li se vzorek, veškerá látka se před zkoušením rozemele na prach, aby se zmenšila velikost částic během skladování a manipulace; v opačném případě se látka zkouší v původním stavu. Zkouška by měla být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku.

1.6.4.3 *Provedení zkoušky*

Přikapávací nálevka aparatury se naplní 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovy baňky se vpraví 10 g látky. Objem uvolňovaného plynu se měří jakýmkoli vhodným způsobem. Kohout přikapávací nálevky se otevře, aby voda natekla do Erlenmeyerovy baňky, a současně se spustí stopky. Objem vzniklého plynu se měří každou hodinu po dobu sedmi hodin. Je-li vývin plynu během této doby nepravidelný nebo narůstá-li na konci této doby rychlost vývinu, prodlouží se doba měření na maximálně pět dnů. Překročí-li rychlost vývinu plynu v průběhu měření 1 litr na kg látky za hodinu, může být zkouška přerušena. Zkouška se provede třikrát.

Není-li chemická identifikace plynu známa, měl by být analyzován. Obsahuje-li plyn vysoce hořlavé složky a není-li známo, zda není celá směs vysoce hořlavá, připraví se směs stejného složení a provede se zkouška podle metody A.11.

2. **DATA**

Látka se považuje za nebezpečnou, jestliže:

— na kterémkoli stupni zkušebního postupu dojde k jejímu samovolnému vznícení,

nebo

— dojde-li k vývinu hořlavého plynu rychlostí vyšší než 1 litr na kg látky za hodinu.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— podrobnosti o jakékoli počáteční přípravě látky,

▼B

— výsledky zkoušek (stupně 1, 2, 3 a 4),

— chemická identifikace uvolňovaného plynu,

— rychlost vývinu plynu, pokud se provádí stupeň 4 (1.6.4),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

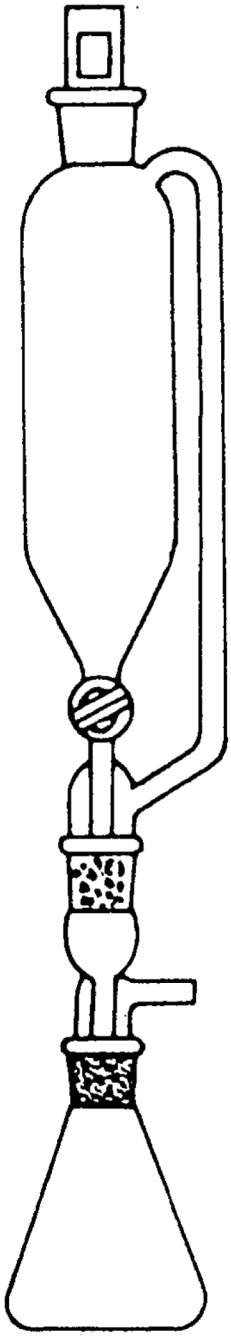
2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Doplněk

Obrázek

Aparatura



▼B

A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN

1. METODA

1.1 ÚVOD

Zkušební postup je použitelný pro pevné látky nebo kapaliny, které se již v malých množstvích samovolně vznítí krátce poté, co při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) přijdou do styku se vzduchem.

Tato metoda se nevztahuje na látky, které se na vzduchu při laboratorní teplotě nebo při zvýšené teplotě vznítí teprve po několika hodinách nebo dnech.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Látky mají pyroforické vlastnosti, pokud se samovolně vznítí nebo vykazují zuhelnatění za podmínek, které jsou popsány v bodě 1.6.

Může být nezbytné provést zkoušku teploty samozápalu podle metody A.15. Bod samozápalu (kapaliny a plyny).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Pevná nebo kapalná látka se nanese na inertní nosič a uvede se při teplotě okolí na dobu pěti minut do styku se vzduchem. Pokud se kapaliny nevznítí, jsou absorbovány do filtračního papíru a vystaví se působení vzduchu po dobu pěti minut při teplotě okolí (přibližně 20 °C). Pokud se pevná látka nebo kapalina vznítí nebo pokud kapalina zapálí či zuhelnatí filtrační papír, považuje se za pyroforickou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost: vzhledem k závažnosti z hlediska bezpečnosti stačí jediný pozitivní výsledek k tomu, aby byla látka považována za pyroforickou.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Porcelánový kelímek o průměru přibližně 10 cm se při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) naplní do výšky asi 5 mm infuzoriovou hlinkou.

Poznámka:

Infuzoriová hlinka nebo jiná srovnatelná běžně dosažitelná inertní látka se považuje za reprezentativní materiál pro zeminu, do které může zkoušená látka proniknout v případě havárie.

Pro zkoušení kapalin, které se při kontaktu se vzduchem na inertním nosiči samovolně nevznítí, se požaduje suchý filtrační papír.

▼B

1.6.2 **Provedení zkoušky**

a) *Práškovité pevné látky*

1 až 2 cm^3 práškovité látky, která má být zkoušena, se sype z výšky přibližně 1 m na nehořlavý povrch a sleduje se, zda se látka při pádu nebo v průběhu dalších pěti minut po dopadu vznítí.

Zkouška se provede šestkrát, pokud ke vznícení nedojde dříve.

b) *Kapaliny*

Přibližně 5 cm^3 kapaliny, která má být zkoušena, se nalije do připraveného porcelánového kelímku a sleduje se, zda se v průběhu pěti minut vznítí.

Pokud při šesti zkouškách nedojde ke vznícení, provede se tato zkouška:

0,5 ml zkoušeného vzorku se vpraví pomocí injekční stříkačky na zprohýbaný filtrační papír a sleduje se, zda do 5 minut od přidání kapaliny dojde ke vznícení nebo zuhelnatění filtračního papíru. Zkouška se provede třikrát, nedojde-li ke vznícení nebo zuhelnatění dříve.

2. **DATA**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Zkoušky lze přerušit, jakmile je dosaženo pozitivního výsledku v kterékoli zkoušce.

2.2 VYHODNOCENÍ

Jestliže se látka v průběhu 5 minut po nanesení na inertní nosič a vystavení působení vzduchu vznítí nebo pokud kapalná látka zuhelnatí či zapálí filtrační papír do pěti minut po nanesení a vystavení vzduchu, považuje se za pyroforickou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky zkoušek,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda u pevné nebo pastovité látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene (citlivost na působení tepla), nárazu nebo tření (citlivost na mechanické podněty), a zda u kapalné látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene nebo nárazu.

Metoda sestává ze tří částí:

a) zkouška citlivosti na působení tepla (1);

b) zkouška mechanické citlivosti na náraz (1);

c) zkouška mechanické citlivosti na tření (1).

Metoda poskytuje data pro stanovení pravděpodobnosti vyvolání výbuchu určitými běžnými podněty. Metoda neslouží ke zjištění, zda je látka schopna vybuchnout za jakýchkoli podmínek.

Metoda je vhodná pro zjištění, zda u látky existuje nebezpečí výbuchu (citlivost na působení tepla a mechanická citlivost) za určitých podmínek specifikovaných ve směrnici. Je založena na řadě typů zařízení, která jsou široce používána v mezinárodním měřítku (1) a která obvykle poskytují vypovídající výsledky. Připouští se, že tato metoda není definitivní. Lze použít jiné než specifikované zařízení, za předpokladu, že je mezinárodně uznané a že lze výsledky vhodným způsobem srovnat s výsledky poskytnutými specifikovaným zařízením.

Zkouška nemusí být provedena, jestliže z dostupných termodynamických informací (např. ze slučovacího tepla nebo disociačního tepla) a/nebo z nepřítomnosti určitých reakčních skupin (2) ve struktuře s jistotou vyplývá, že látka nemá schopnost rychle se rozkládat za vývoje plynů nebo za uvolňování tepla (tzn. materiál nepředstavuje žádné riziko výbuchu). Zkouška mechanické citlivosti na tření se nevyžaduje u kapalin.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Výbušná látka:

Látka, která může vybuchnout působením plamene nebo která je citlivá na náraz nebo tření ve specifikovaném zařízení (nebo je mechanicky citlivější než 1,3-dinitrobenzen v alternativním zařízení).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

1,3-dinitrobenzen, technický krystalický výrobek, prosetý na sítu o velikosti oka 0,5 mm, pro metody citlivosti na tření a na náraz.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (označovaný jako RDX nebo hexogen nebo cyklonit – CAS 121-82-4) rekrystalizovaný z vodného cyklohexanonu, prosetý za mokra na sítě 250 μm a zachycený na sítě 150 μm, sušený 4 hodiny při 103 ± 2 °C pro druhou sérii zkoušek citlivosti na tření a na náraz.

▼B

1.4 PODSTATA METODY

Pro zjištění bezpečných podmínek pro provedení tří zkoušek citlivosti jsou nezbytné předběžné zkoušky.

1.4.1 **Zkoušky bezpečného zacházení (3)**

Z bezpečnostních důvodů se před provedením hlavních zkoušek podrobí velmi malé neuzavřené vzorky látky (přibližně 10 mg) zahřívání v plameni plynového hořáku, nárazu v jakémkoli vhodném zařízení a tření za použití paličky proti podložce nebo jiného zařízení pro zkoušení citlivosti natření. Účelem předběžných zkoušek je zjistit, zda je látka tak citlivá a výbušná, že by měly být předepsané zkoušky citlivosti, zvláště zkouška citlivosti na působení tepla, prováděny za zvláštních bezpečnostních opatření, aby nedošlo k poranění osoby provádějící zkoušky.

1.4.2 **Citlivost na působení tepla**

Metoda spočívá v zahřívání látky v ocelové trubce uzavřené clonami s různými průměry otvorů s cílem zjistit, zda může za podmínek intenzivního zahřívání a při definovaném utěsnění vybuchnout.

1.4.3 **Mechanická citlivost (na náraz)**

Metoda spočívá ve vystavení látky nárazu specifikovaným závažím puštěným ze specifikované výšky.

1.4.4 **Mechanická citlivost (na tření)**

Metoda spočívá ve vystavení pevných nebo pastovitých látek tření mezi standardními povrchy za specifikovaných podmínek zatížení a vzájemného pohybu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Citlivost na působení tepla (na působení plamene)**

1.6.1.1 *Zařízení*

Zařízení je tvořeno ocelovou trubkou na jedno použití s opakovaně použitelným uzavíracím zařízením (obrázek 1), instalovanou v ohřívacím a ochranném zařízení. Každá trubka je hlubokotažená z ocelového plechu (viz doplněk) a má vnitřní průměr 24 mm, délku 75 mm a tloušťku stěny 0,5 mm. Na otevřeném konci trubky je příruba sloužící k uzavření trubky sestavou clony. Sestava je tvořena clonou se středovým otvorem odolnou vůči tlaku, připevněnou k trubce pomocí dvoudílného šroubového spoje (matice a závitové příruby). Matice a závitová příruba jsou zhotoveny z chrommanganové oceli (viz doplněk), která je do 800 °C nejiskřivá. Clony mají tloušťku 6 mm, jsou vyrobeny ze žáruvzdorné oceli a tvoří řadu podle velikosti otvorů.

▼B

1.6.1.2 *Zkušební podmínky*

Látka se obvykle zkouší ve stavu, v jakém byla obdržena, ačkoliv v některých případech, např. je-li lisovaná, litá nebo jiným způsobem zhutněná, může být nezbytné ji před provedením zkoušky rozdrtit.

U pevných látek se hmotnost látky, která má být použita v každé zkoušce, stanoví zkouškou ve dvou etapách. Zvážená trubka se naplní 9 cm látky a látka se po celém průřezu trubky stlačí silou 80 N. Z bezpečnostních důvodů nebo v případech, kdy může stlačováním dojít ke změně fyzikální formy vzorku, lze použít jiný způsob plnění, například je-li látka velmi citlivá na tření, není vhodné ji stlačovat. Je-li látka stlačitelná, přidá se a stlačuje další množství látky, dokud není trubka zaplněna do úrovně 55 mm od horního okraje. Stanoví se celkové množství látky použité pro naplnění do úrovně 55 mm od horního okraje a přidají se další dva podíly látky, přičemž se každý stlačí silou 80 N. Látka se poté podle potřeby buď přidá a stlačí, nebo se odebere tak, aby byla trubka naplněna do úrovně 15 mm od horního okraje. Provede se druhá zkouška, přičemž se začne s třetinou hmotnosti po stlačení zjištěné v první etapě. Přidají se další dva podíly, stlačí se silou 80 N a podle potřeby se látka přidá nebo odebere do úrovně 15 mm od horního okraje trubky. Množství pevné látky zjištěné ve druhé etapě se použije pro každý pokus; naplnění se provede se třemi stejnými množstvími a každé z nich se stlačí na objem 9 cm bez ohledu na potřebnou sílu (pro usnadnění lze k tomuto účelu použít rozpěrné kroužky).

Kapaliny a gely se naplní do trubky do výšky 60 mm, přičemž je třeba věnovat zvláštní pozornost gelům, aby se v nich netvořily dutiny. Na trubku se zdola navleče závitová příruba, vloží se vhodná clona a po nanesení maziva na bázi disulfidu molybděničitého se matice utáhne. Je důležité se přesvědčit, zda nějaká látka nezůstala zachycena mezi přírubou a clonou nebo v závitech.

K zahřívání se použije propan odebíraný z průmyslové tlakové lahve s regulátorem tlaku (60 až 70 mbar) přes průtokoměr a rovnoměrně rozdělený rozdělovacím potrubím do čtyř hořáků (ověří se vizuálně pozorováním plamenů hořáků). Hořáky se umístí kolem zkušební komory, jak je znázorněno na obrázku 1. Čtyři hořáky mají celkovou spotřebu přibližně asi 3,2 litru propanu za minutu. Lze použít jiné palivo a hořáky, avšak rychlost ohřevu musí být taková, jak je uvedeno na obrázku 3. Rychlost ohřevu se musí u všech zařízení pravidelně kontrolovat za použití trubek naplněných dibutylftalátem, jak je znázorněno na obrázku 3.

1.6.1.3 *Provedení zkoušek*

Každá zkouška se provádí do roztržení trubky nebo dokud doba ohřevu nedosáhne 5 minut. Výsledek zkoušky, při níž došlo k roztržení trubky na tři nebo více úlomků, z nichž některé mohou být vzájemně spojeny úzkými proužky kovu, jak je znázorněno na obrázku 2, se hodnotí jako výbuch. Výsledek zkoušky, při níž vzniklo méně úlomků nebo k roztržení nedošlo, se nehodnotí jako výbuch.

▼B

Nejprve se provede série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 6,0 mm, a pokud nedojde k výbuchu, provede se druhá série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 2,0 mm. Dojde-li k výbuchu u kterékoli zkušební série, nevyžadují se další zkoušky.

1.6.1.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, dojde-li k výbuchu při jedné z výše uvedených zkušebních sérií.

1.6.2 **Mechanická citlivost (na náraz)**

1.6.2.1 *Zařízení (obrázek 4)*

Základními částmi typických zařízení s padacím kladivem je blok z lité oceli s podstavcem, kovadlina, sloup, vodicí lišty, padací závaží, uvolňovací zařízení a držák vzorku. Ocelová kovadlina o průměru 100 mm a výšce 70 mm je přišroubována k horní straně bloku z lité oceli o délce 230 mm, šířce 250 mm a výšce 200 mm se základovou litinovou deskou o délce 450 mm, šířce 450 mm a výšce 60 mm. Sloup tvořený bezešvou taženou ocelovou trubkou je připevněn držákem přišroubovaným na zadní stranu bloku z lité oceli. Čtyři šrouby ukotvují zařízení k betonovému bloku o rozměrech 60 × 60 × 60 cm takovým způsobem, že jsou vodicí lišty dokonale svislé a padací závaží padá volně. Používá se závaží o hmotnosti 5 a 10 kg z pevné oceli. Úderová hlava každého závaží je z tvrzené oceli HRC 60 až 63 a má minimální průměr 25 mm.

Zkoušený vzorek se uzavře do zkušebního zařízení tvořeného dvěma plnými souosými válci umístěnými nad sebou a vodicím pouzdrem tvořeným dutým ocelovým válcem. Plné ocelové válce o průměru 10 (–0,003, –0,005) mm a výšce 10 mm mají vyleštěné plochy, zakulacené hrany (s poloměrem zakřivení 0,5 mm) a tvrdost HRC 58 až 65. Dutý válec musí mít vnější průměr 16 mm, vyleštěný vyvrtaný otvor o průměru 10 (+ 0,005, + 0,010) mm a výšku 13 mm. Sestavené zkušební zařízení se umístí na výměnnou ocelovou mezipodložku (o průměru 26 mm a výšce 26 mm), která je vystředěna kroužkem s otvory pro odvod dýmů.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 40 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení. Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic od 0,5 do 1 mm, který by měl být reprezentativní pro původní látku.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu nebo po odstranění maximálního možného množství ředidla. Kapalné látky se zkoušejí při mezeře 1 mm mezi horním a dolním ocelovým válcem.

▼B

1.6.2.3 *Provedení zkoušek*

Provede se série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 10 kg z výšky 0,40 m (40 J). Dojde-li během těchto šesti zkoušek při 40 J k výbuchu, musí se provést další série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 5 kg z výšky 0,15 m (7,5 J). U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.2.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (vzplanutí nebo třesk jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením nebo je-li vzorek citlivější než 1,3-dinitrobenzen nebo RDX v alternativní zkoušce citlivosti na náraz.

1.6.3 **Mechanická citlivost (na tření)**

1.6.3.1 *Zařízení (obrázek 5)*

Třecí zařízení je tvořeno základovou deskou z lité oceli, na které je upevněno třecí zařízení. To je tvořeno nepohyblivým porcelánovým kolíkem a pohyblivou porcelánovou destičkou. Porcelánová destička je upevněna na saních vedených dvěma vodicími lištami. Saně jsou připojeny k elektromotoru ojnicí, excentrickou vačkou a vhodným ozubeným převodem tak, že porcelánová destička vykonává pod porcelánovým kolíkem pohyb tam a zpět na dráze o délce 10 mm. Porcelánový kolík lze zatížit silou buď 120 N, nebo 360 N.

Rovné porcelánové destičky jsou vyrobeny z bílého technického porcelánu (o drsnosti 9 až 32 um) a mají délku 25 mm, šířku 25 mm a výšku 5 mm. Válcový porcelánový kolík je rovněž vyroben z bílého technického porcelánu, má délku 15 mm, průměr 10 mm a zdrsněné kulové plochy s poloměrem zakřivení 10 mm.

1.6.3.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 10 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení.

Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic < 0,5 mm.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu. Nelze-li látku připravit v suchém stavu, zkouší se pasta (po odstranění maximálního možného množství ředidla) ve formě proužku o tloušťce 0,5 mm, šířce 2 mm a délce 10 mm připraveného v tvarovací formě.

▼B

1.6.3.3 *Provedení zkoušek*

Porcelánový kolík se přiloží na zkoušený vzorek a zatíží se. Při provádění zkoušky musí být rýhy v porcelánové destičce orientovány příčně ke směru pohybu. Je nutné dbát na to, aby kolík spočíval na vzorku, aby pod kolíkem leželo dostatečné množství zkoušeného materiálu a také aby se destička pohybovala pod kolíkem správně. U pastovitých látek se pro nanesení látky na destičku používá měrka o tloušťce 0,5 mm s otvorem 2 × 10 mm. Porcelánová destička se musí pohybovat pod porcelánovým kolíkem po dráze 10 mm tam a zpět za 0,44 s. Každá část povrchu destičky a kolíku se smí použít pouze jednou; dva konce každého kolíku slouží pro dva pokusy a každá ze dvou stran destičky slouží pro tři pokusy.

Série šesti zkoušek se provede se zatížením 360 N. Získá-li se během těchto šesti zkoušek pozitivní výsledek, musí se provést další série šesti zkoušek se zatížením 120 N. U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.3.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (praskání, třesk nebo vzplanutí jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením pro stanovení citlivosti na tření nebo splňuje-li ekvivalentní kritéria alternativní zkoušky citlivosti na tření.

2. **DATA**

Látka se v zásadě považuje ve smyslu této směrnice za nebezpečnou z hlediska výbuchu, jestliže jsou získány pozitivní výsledky ve zkoušce citlivosti na působení tepla, ve zkoušce citlivosti na náraz nebo na tření.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, obsah vlhkosti atd.,

— fyzikální forma vzorku, zda se vzorek drtil, mlel nebo prosíval,

— údaje zjištěné při zkoušce citlivosti na působení tepla (např. hmotnost vzorku a počet úlomků atd.),

— pozorované jevy při zkoušce mechanické citlivosti (např. tvorba značného množství dýmu nebo úplný rozklad bez třesku, plameny, jiskry, třesk, praskání atd.),

— výsledky každého typu zkoušky,

— bylo-li použito alternativní zařízení, musí být uvedeno vědecké zdůvodnění použití a důkaz srovnatelnosti výsledků získaných se specifikovaným zařízením a výsledků získaných s rovnocenným zařízením,

▼B

— všechny užitečné poznámky, například odkaz na zkoušky podobných látek, které by mohly mít význam pro správné hodnocení výsledků,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny všechny výsledky, které jsou považovány za chybné, anomální nebo nereprezentativní. Má-li být kterýkoli z těchto výsledků vyloučen, mělo by být uvedeno vysvětlení a výsledky jakéhokoli alternativního nebo doplňkového zkoušení. Pokud nelze anomální výsledek vysvětlit, musí být přijat tak, jak byl dosažen, a musí být použit k odpovídající klasifikaci látky.

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6–13 and 30–42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use -Determination of explosion risk.

▼B

Doplněk

příklad materiálové specifikace pro zkoušku citlivosti na působení tepla (viz DIN 1623)

1) Trubka: materiálová specifikace č. 1.0336.505 g

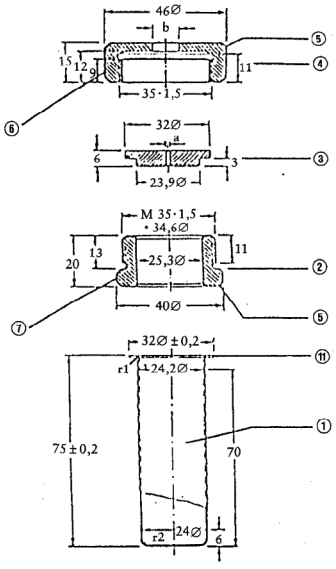
2) Clona s otvorem: materiálová specifikace č. 1.4873

3) Závitová příruba a matice: materiálová specifikace č. 1.3817

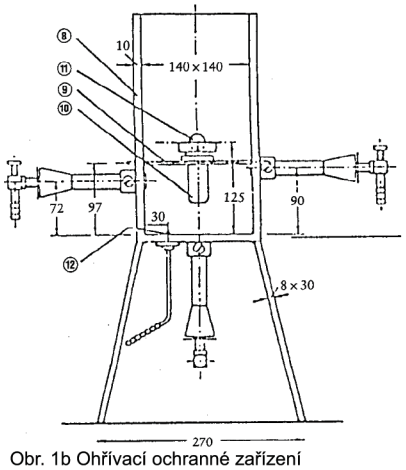
Obrázek 1

Zařízení pro zkoušku citlivosti na působení tepla

(všechny rozměry v mm)



Obr. 1a Ocelová trubka a příslušenství



Obr. 1b Ohřívací ochranné zařízení

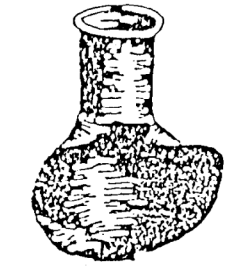
1. Trubka
1a. Vnější příruba
2. Prstenec se závitem (závit s nízkým třením)
3. Clona s otvorem o průměru a = 2,0 nebo 6,0 mm
4. Matice s otvorem o průměru b = 10 mm
5. Zkosená hrana
6. Dvě rovné plošky pro klíč 41
7. Dvě rovné plošky pro klíč 36
8. Ochranný kryt odolný vůči střepinám
9. Dvě opěrné tyče pro trubku
10. Sestavená trubka
11. Poloha zadního hořáku: ostatní hořáky jsou vidět
12. Zapalovací hořáček

▼B

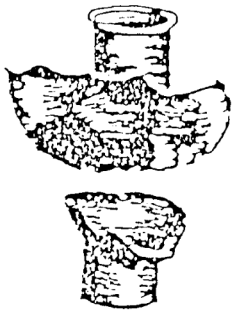
Obrázek 2

Zkouška citlivosti na působení tepla

(příklady roztržení trubky)



Nehodnotí se jako výbuch



Nehodnotí se jako výbuch



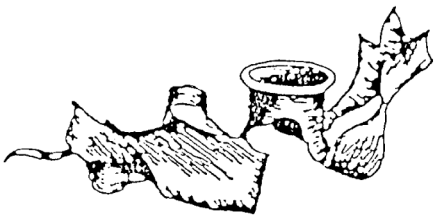
Výbuch



Výbuch



Výbuch

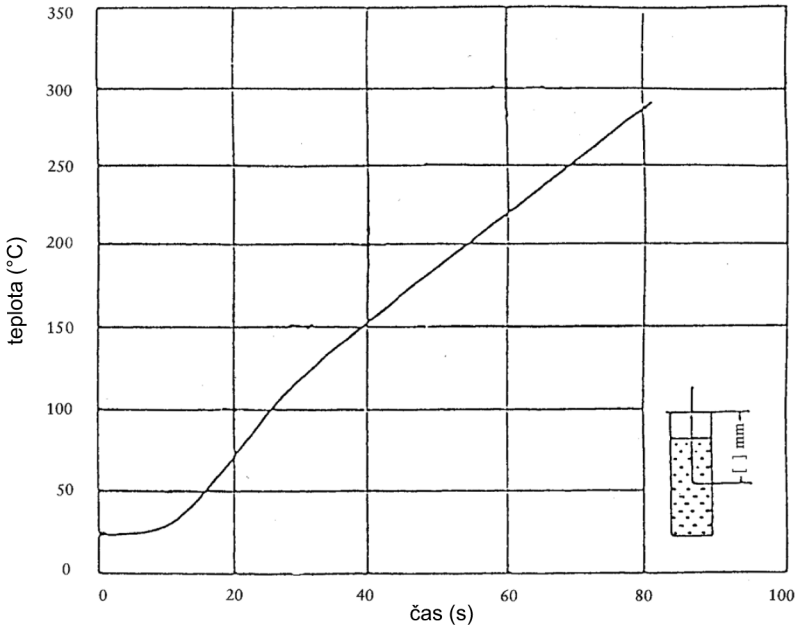


Výbuch

▼B

Obrázek 3

Kalibrace rychlosti ohřevu pro zkoušku citlivosti na působení tepla



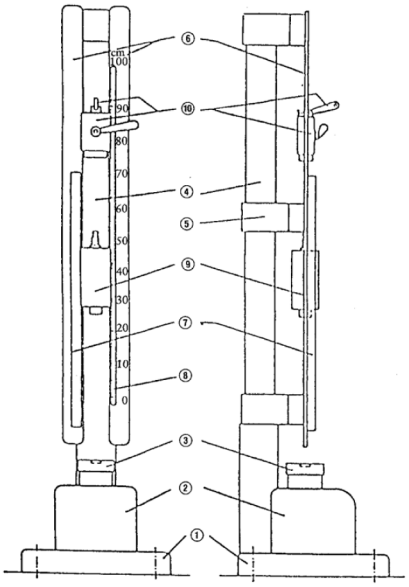
Křivka závislosti teploty na čase získaná při zahřívání dibutyl-ftalátu (27 cm^3) v uzavřené trubce (s clonou 1,5 mm) při průtoku propanu 3,2 litry za minutu. Teplota byla měřena chromel/alumelovým termočlánkem o průměru 1 mm, zapouzdřeným v korozivzdorné oceli a umístěným 43 mm pod okrajem trubky. Rychlost zahřívání mezi 135 °C a 285 °C by měla být 185 až 215 K/min.

▼B

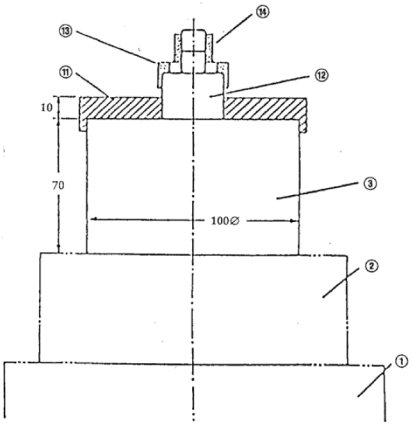
Obrázek 4

Zařízení pro zkoušku citlivosti na mráz

(všechny rozměry v mm)



Obr. 4a Padací kladivo, čelní a boční celkový pohled



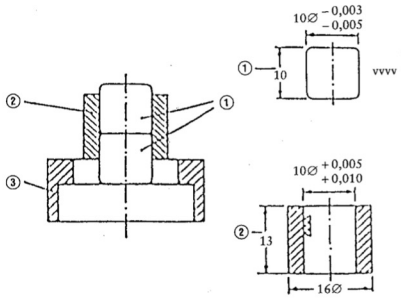
Obr. 4b Padací kladivo, spodní část

1. Základová deska 450 × 450 × 60
2. Blok z oceli 230 × 250 × 200
3. Kovadlina, průměr 100 × 70
4. Sloup
5. Střední nosník
6. Dvě vodicí lišty
7. Ozubená tyč
8. Měřítko
9. Padací kladivo
10. Zadržovací a uvolňovací zařízení
11. Středicí objímka
12. (Výměnná) mezipodložka o průměru 26 × 26
13. Středicí kroužek s otvory
14. Nárazové zařízení

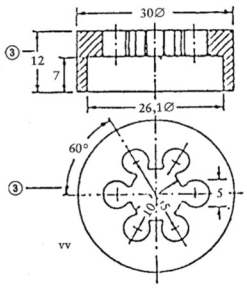
▼B

Obrázek 4

Pokračování

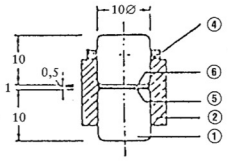


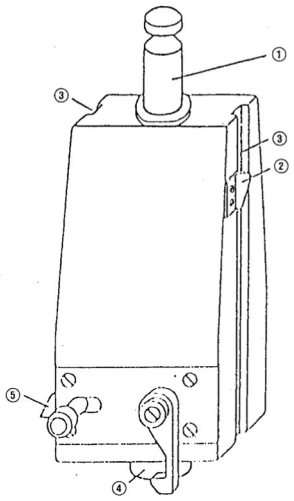
Obr. 4c Zařízení pro zkoušku citlivosti práškových a pastových látek na náraz



Obr. 4d Zařízení pro zkoušku citlivosti kapalných látek na náraz

1. Ocelové válečky
2. Vodicí pouzdro pro ocelové válečky
3. Středicí kroužek s otvory
   a) svislý řez
   b) průřez
4. Pryžový prstenec
5. Kapalná látka (40 mm^3)
6. Prostor bez kapaliny





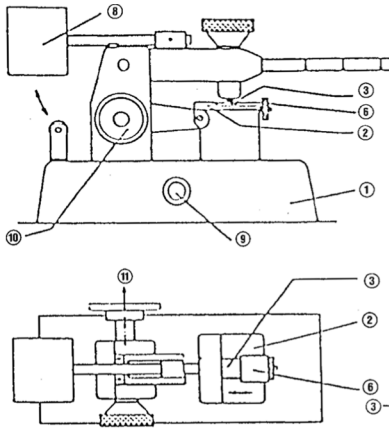
Obr. 4e Kladivo (závaží 5 kg)

1. Upínací čep
2. Polohová značka
3. Vodicí drážky
4. Úderník
5. Aretační zařízení

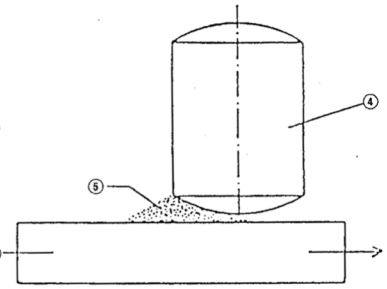
▼B

Obrázek 5

Zařízení pro zkoušku citlivosti na tření



Obr. 5a Třecí zařízení, boční a půdorysný pohled



Obr. 5b Výchozí poloha válečku a vzorku

1. Ocelový podstavec
2. Pohyblivé sáně
3. Porcelánová destička, 25 × 25 × 25 mm, upevněná na saních
4. Upevněný porcelánový kolík 10 × 15 mm
5. Zkoušený vzorek, přibližně 10 mm^3
6. Držák kolíku
7. Zatěžovací rameno
8. Protižávaží
9. Kolečko pro nastavení saní do výchozí polohy
10. Směr k elektromotoru

▼B

A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)

METODA

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky. Zkušební postup je použitelný pro plyny, kapaliny a páry, které se mohou za přítomnosti vzduchu vznítit na horkém povrchu.

Bod samozápalu může být značně snížen vlivem katalytických nečistot, materiálu povrchu nebo většího objemu zkušební nádoby.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Míra schopnosti látky samovolně se vznítit se vyjadřuje teplotou samozápalu. Bod samozápalu je nejnižší teplota, při které se zkoušená látka smíchaná se vzduchem za podmínek stanovených v této zkušební metodě vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky jsou uvedeny v normách (viz 1.6.3). Měly by především sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Metodou se stanoví minimální teplota vnitřního povrchu uzavřeného prostoru, která způsobí vznícení plynu, páry nebo kapaliny vpravených do tohoto prostoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodů samozápalu a na použité zkušební metodě.

Citlivost a specifičnost závisejí na použité zkušební metodě.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Aparatura je popsána v metodě uvedené v bodě 1.6.3.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Vzorek zkoušené látky se zkouší metodou uvedenou v bodě 1.6.3.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Viz IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DATA**

Zaznamená se zkušební teplota, atmosférický tlak, množství použitého zkouseného vzorku a časová prodleva před vznícením.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— použité množství vzorku, atmosférický tlak,

— použitá aparatura,

— výsledky měření (zkušební teploty, výsledky týkající se vznícení, příslušná časová prodleva),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

▼B

A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK

1. METODA

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky.

Účelem této zkoušky je poskytnout předběžnou informaci o schopnosti pevných látek samovolně se vznítit za zvýšených teplot.

Pokud teplo uvolňované buď reakcí látky s kyslíkem, nebo exotermním rozkladem není dostatečně rychle odváděno do okolí, nastává samovolné zahřívání látky, které může vést až k jejímu samozápalu. K samozápalu tedy dojde, je-li rychlost vývinu tepla vyšší než rychlost odvádění tepla.

Zkušební postup je užitečný jako předběžná screeningová zkouška pro pevné látky. Z hlediska složité povahy vznícení a hoření pevných látek by měl být bod samozápalu stanovený touto metodou použit pouze ke srovnávacím účelům.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod samozápalu získaný touto metodou je minimální teplota okolí látky vyjádřená ve °C, při které se určité množství látky za definovaných podmínek vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PODSTATA METODY

Určité množství vzorku zkoušené látky se za teploty okolí vloží do pece; zatímco se teplota pece zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min na 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší, zaznamenává se křivka závislosti teploty ve středu zkoušeného vzorku na čase. Pro účely této zkoušky se za bod samozápalu látky považuje teplota pece, při které dosáhne teplota zkoušeného vzorku samovolným zahříváním 400 °C.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Žádná.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

1.6.1.1 *Pec*

Laboratorní pec (o obsahu přibližně 2 litry) vybavená programovatelnou regulací teploty, přirozenou cirkulací vzduchu a pojistným přetlakovým zařízením. Aby se předešlo možnému riziku výbuchu, nesmí přijít rozkladné plyny do styku s elektrickými topnými elementy.

▼B

1.6.1.2 *Krychle z drátěného pletiva*

Podle šablony na obrázku 1 se vystřihne kus z drátěného korozi vzdorného pletiva o velikosti otvorů 0,045 mm. Vystřižený kus se složí do formy nahoře otevřené krychle a zajistí se drátkem.

1.6.1.3 *Termočlánky*

Vhodné termočlánky.

1.6.1.4 *Zapisovač*

Jakýkoli dvoukanálový zapisovač kalibrovaný pro teploty od 0 °C do 600 °C nebo jim odpovídající napětí.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Látky se zkouší ve stavu, v jakém byly obdrženy.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Drátěná krychle se naplní zkoušenou látkou, jemně se poklepe a přidá se tolik látky, aby byla krychle zcela naplněna. Krychle se poté při laboratorní teplotě zavěsí do středu pece. Jeden termočlánek se umístí do středu krychle a druhý mezi krychli a stěnu pece pro záznam teploty pece.

Teploty pece a vzorku se nepřetržitě zaznamenávají, zatímco se teplota pece plynule zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min až do teploty 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší.

Když se látka vznítí, termočlánky zaznamenají velmi prudký nárůst teploty nad teplotou pece.

2. **DATA**

Pro hodnocení je důležitá teplota pece, při které dosáhla teplota vzorku samovolným zahříváním 400 °C (viz obrázek 2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis zkoušené látky,

— výsledky měřeni včetně křivky závislosti teploty na čase,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

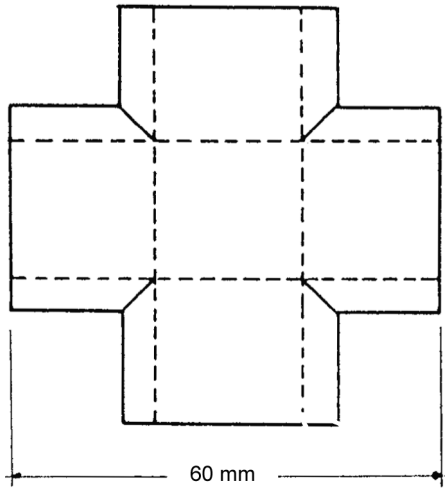
4. **LITERATURA**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

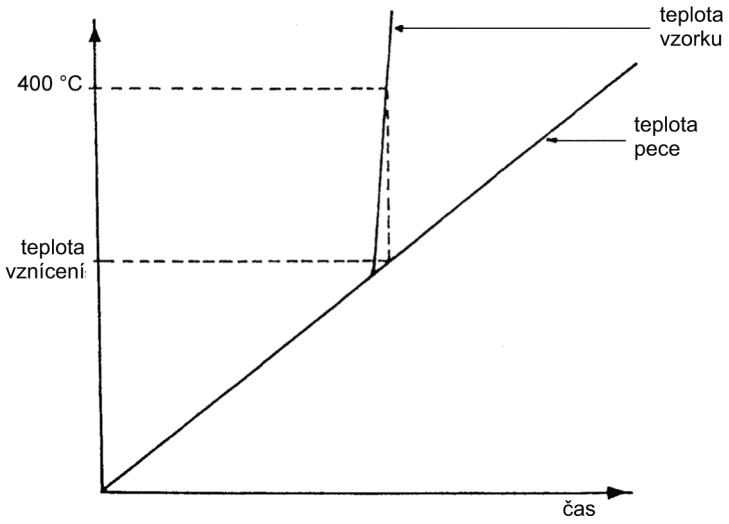
Obrázek 1

Šablona krychle o délce strany 20 mm



Obrázek 2

Typická křivka závislosti teploty na čase



▼B

A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro kapaliny, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo pro organické peroxidy.

Zkouška se neprovádí, jestliže ze strukturního vzorce bez pochyby vyplývá, že tato látka nemá schopnost exotermně reagovat s hořlavým materiálem.

Ke zjištění, zda by se zkouška neměla provádět za speciálních bezpečnostních opatření, je třeba provést předběžnou zkoušku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření: doba reakce v sekundách potřebná k průchodu reakční zóny prachovou housenkou podle postupu popsaného v bodě 1.6.

Rychlost hoření: vyjadřuje se v mm/s.

Maximální rychlost hoření: nejvyšší hodnota rychlosti hoření, která byla naměřena pro směsi obsahující 10 až 90 % hmot. oxidující látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Pro zkoušku a pro předběžnou zkoušku se jako referenční látka používá dusičnan barnatý čistoty p.a.

Referenční směsí je směs dusičnanu barnatého a práškové celulosy připravená podle bodu 1.6, která má maximální rychlost hoření (obvykle jde o směs obsahující 60 % hmot. dusičnanu barnatého).

1.4 PODSTATA METODY

V zájmu bezpečnosti se provede předběžná zkouška. Jestliže předběžná zkouška jasně prokáže, že látka má oxidační vlastnosti, žádné další zkoušky se nevyžadují. Není-li tomu tak, podrobí se látka úplné zkoušce.

Při úplné zkoušce se látka, která má být zkoušena, a definovaná hořlavá látka smísí v různých poměrech. Každá směs je poté upravena do tvaru prachové housenky a ta se na jednom konci zapálí. Stanovená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Vhodná je každá technika mletí a mísení, pro niž se neliší maximální rychlosti hoření v šesti samostatných zkouškách od aritmetického průměru o více než 10 %.

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Zkoušená látka*

Velikost částic zkoušeného vzorku se sníží na < 0,125 mm následujícím postupem: zkoušená látka se proseje, podíl zachycený na sítě se drtí a celý postup se opakuje, dokud celá zkoušená dávka neprojde sítem.

Lze použít jakoukoli techniku mletí a prosévání, která vyhoví kritériím jakosti.

Před přípravou směsi se látka suší při 105 °C do konstantní hmotnosti. Pokud se zkoušená látka rozkládá při teplotě nižší než 105 °C, musí se látka sušit při vhodné nižší teplotě.

1.6.1.2 *Hořlavá látka*

Jako hořlavá látka se používá prášková celulosa. Doporučuje se typ celulosy používaný pro chromatografii na tenké vrstvě nebo pro sloupcovou chromatografii. Jako vhodný se prokázal typ, který má délku více než 85 % vláken od 0,020 mm a 0,075 mm. Celulosový prášek se proseje sítem o velikosti oka 0,125 mm. V průběhu zkoušky se používá tatáž šarže celulosy.

Před přípravou směsi se prášková celulosa suší při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Pokud se při předběžné zkoušce použije dřevitá moučka, připraví se z měkkého dřeva shromážděním podílu, který projde sítem o velikosti oka 1,6 mm, důkladným promícháním a následným sušením čtyři hodiny při teplotě 105 °C ve vrstvě o tloušťce nepřesahující 25 mm. Ochladí se a do okamžiku použití, ke kterému by mělo dojít nejlépe do 24 hodin, se uchovává v co nejvíce naplněné vzduchotěsné nádobě.

1.6.1.3 *Zdroj zapálení*

Jako zdroj zapálení se použije plamen plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm). Použije-li se jiný zdroj zapálení (např. při zkoušce v inertní atmosféře), uvede se popis a zdůvodnění.

1.6.2 **Provedení zkoušky**

Poznámka:

Směsi oxidantů a celulosy nebo dřevité moučky se musí považovat za potenciálně výbušné a musí se s nimi zacházet s náležitou opatrností.

1.6.2.1 *Předběžná zkouška*

Vysušená látka se důkladně promíchá s vysušenou celulosou nebo dřevitou moučkou v poměru 2 hmotnostní díly zkoušené látky a 1 hmotnostní díl celulosy nebo dřevité moučky a směs se upraví do tvaru malého kužele o rozměrech 3,5 cm (průměr základny) × 2,5 cm (výška) naplněním bez pěchování do kuželové formy (např. do laboratorní skleněné nálevky s utěsněným stonkem).

▼B

Zkoušený vzorek se položí na chladnou, nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou podkladovou desku. Zkouška se provede v digestoři podle bodu 1.6.2.2.

Zdroj zapálení se přiloží ke kuželu. Sleduje se a zaznamená se prudkost a doba trvání výsledné reakce.

Látka se považuje za oxidující, je-li reakce prudká.

V případě, že výsledek vzbuzuje pochybnosti, je nezbytné vykonat úplnou níže popsanou zkoušku s prachovou housenkou.

1.6.2.2 *Zkouška s prachovou housenkou*

Připraví se směsi oxidantu s celulosou obsahující 10 až 90 % hmot. oxidantu, po 10 % přírůstcích. Přesnější hodnota maximální rychlosti hoření se v mezních případech získá použitím mezilehlé směsi oxidantu s celulosou.

Zkoušený vzorek se upraví pomocí formy. Kovová forma je 250 mm dlouhá a má trojúhelníkový příčný průřez o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní dvě kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se bez zhutnění naplní mírným přebytkem směsi. Po spuštění formy z výšky 2 cm na pevný povrch se přebytek látky seškrábne stěrkou. Bočnice se odstraní a zbývající prášek se uhladí válečkem. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma odstraní.

Zkoušený vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení by se měly postavit ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

Zkouška se provede co nejrychleji s ohledem na hygroskopičnost celulosy a některých zkoušených látek.

Jeden konec prachové housenky se zapálí plamenem hořáku.

Poté, co reakční zóna dosáhne vzdálenosti 30 mm, měří se doba, za kterou se reakce rozšíří na vzdálenost 200 mm.

Zkouška se provede s referenční látkou a alespoň jednou s každou z řady směsí zkoušené látky s celulosou.

Pokud se zjistí, že maximální rychlost hoření je značně vyšší, než rychlost hoření referenční směsi, lze zkoušku ukončit; v opačném případě se zkouška opakuje pětkrát s každou ze tří směsí s nejvyššími rychlostmi hoření.

▼B

Existuje-li podezření, že je výsledek falešně pozitivní, opakuje se zkouška s inertní látkou se stejnou velikostí částic, např. s křemelinou, namísto celulosy. Směs zkoušené látky s celulosou s nejvyšší rychlostí hoření by měla být eventuálně znovu zkoušena v inertní atmosféře (s obsahem kyslíku < 2 % obj.).

2. **DATA**

Z bezpečnostních důvodů se považuje za charakteristickou oxidační vlastnost zkoušené látky maximální rychlost hoření, nikoli průměrná hodnota.

Pro vyhodnocení je důležitá nejvyšší hodnota rychlosti hoření zjištěná v šesti zkouškách dané směsi.

Do grafu se vynesou nejvyšší hodnoty rychlosti hoření pro každou směs proti koncentraci oxidantu. Z grafu se odečte nejvyšší rychlost hoření.

Šest hodnot rychlosti hoření naměřených pro směs s maximální rychlostí hoření se nesmí lišit od aritmetického průměru o více než 10 %; v opačném případě se musí zlepšit technika drcení a mísení.

Naměřená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi (viz 1.3).

Provedou-li se zkoušky v inertní atmosféře, porovná se maximální rychlost reakce s rychlostí naměřenou pro referenční směs v inertní atmosféře.

3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, vlhkost atd.,

— jakákoli úprava zkoušeného vzorku (např. drcení, sušení),

— zdroj zapálení použitý při zkouškách,

— výsledky měření,

— charakter reakce (např. vzplanutí na povrchu, hoření v celé hmotě, jakékoli informace o produktech hoření atd.),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, včetně popisu prudkosti reakce (hoření plamenem, jiskření, uvolňování dýmu, pomalé doutnání atd.) a přibližné doby trvání předběžné bezpečnostní/screeningové zkoušky jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku,

— výsledky ze zkoušek s inertní látkou, pokud byly prováděny,

— výsledky ze zkoušek v inertní atmosféře, pokud byly prováděny.

▼B

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Látka je považována za oxidující, je-li:

a) při předběžné zkoušce zjištěna prudká reakce;

b) při úplné zkoušce maximální rychlost hoření zkoušených směsí vyšší nebo stejná jako maximální rychlost hoření referenční směsi celulosy a dusičnanu barnatého.

S cílem vyloučit falešně pozitivní výsledky by měly být vzaty v úvahu také výsledky získané při zkoušení látky ve směsi s inertním materiálem a/nebo při zkoušce v inertní atmosféře.

4. **LITERATURA**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

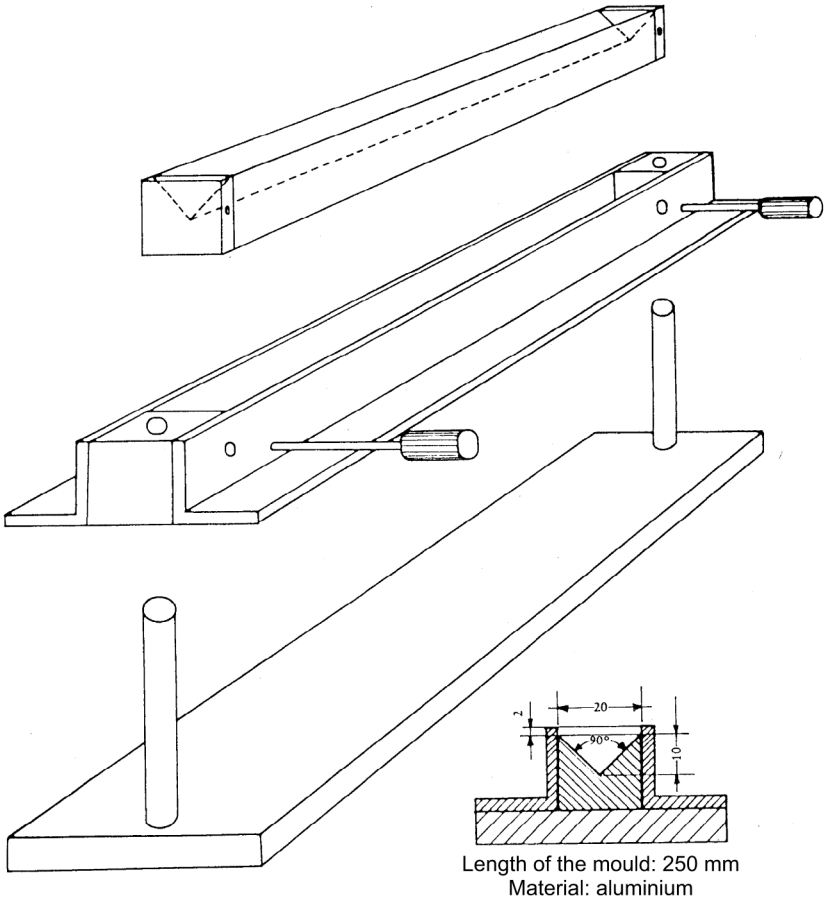
▼B

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku ve tvaru prachové housenky

(všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼B

A.18 POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ

1. METODA

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 118 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Početně průměrná molekulová hmotnost M_na hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i x M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kde:

H_i je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i,

M_i je molekulová hmotnost frakce polymeru s retenčním objemem V_i a

n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. k tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylenglykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly(akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoli. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpce a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různými polystyrenovými standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vynesen logaritmus molekulové hmotnosti.

▼B

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava standardních roztoků polystyrenu**

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstřikovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstřikovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstřikované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech 30 cm × 7,8 mm jsou obvykle 40 až 100 µl. Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 µl. Optimální poměr mezi vstřikovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 **Příprava roztoku vzorku**

Stejné požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 um.

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

1.6.3 **Přístroje a pomůcky**

— zásobník rozpouštědla,

— odplynovací zařízení (podle potřeby),

— dávkovací čerpadlo,

▼B

— tlumič rázů (podle potřeby),

— vstřikovací systém,

— chromatografické kolony,

— detektor,

— průtokoměr (podle potřeby),

— zapisovač,

— nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.4 **Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla**

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem, nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.5 **Kolona**

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

1.6.6 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{nebo} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

▼B

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.7 **Separační účinnost**

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje roh také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibrační křivky. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kde,

$V_{e,\,Mx}$ = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x,

$V_{e,(10.Mx)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností.

Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde,

V_{e1}, V_{e2} = Jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

1.6.8 **Rozpouštědla**

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.9 **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a veden) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

▼B

1.6.10 **Detektor**

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem kyvety detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 µl, s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. k detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. ÚDAJE A PŘEDKLÁDANÍ ZPRAV

2.1 ÚDAJE

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně.

Pro každé měření musí být uvedeny hodnoty M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty log M_p (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Početně a hmotnostně průměrné molekulové hmotnosti se obecně určí elektronickým zpracováním údajů založeným na rovnicích v bodě 1.2. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti log M). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),

▼B

— popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 **Přístrojové vybavení:**

— zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,

— dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstřikovací systém,

— separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),

— počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),

— informace o symetrii pík,

— teplota kolony, způsob řízení teploty,

— detektor (princip měření, typ, objem kyvety),

— průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),

— systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 **Kalibrace systému:**

— podrobný popis metody použité pro sestrojení kalibrační křivky,

— informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),

— informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,

— všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:

  — název vzorku,

  — výrobce vzorku,

  — charakteristické hodnoty standardů M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,

  — vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,

▼B

— hodnota M_p použitá po kalibraci

— eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximu píku,

— hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,

— chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 **Hodnocení:**

— hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),

— informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času.

— informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,

— popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,

— příprava a postupy předúpravy vzorku,

— popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,

— vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),

— pozorované skutečnosti, které vedou k odchylkám od ideálních charakteristik metody GPC,

— podrobný popis všech změn zkušebních postupů,

— podrobnosti o rozsahu chyb,

— jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. **LITERATURA**

1) DIN 55672 (1995) GelpermeationsChromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Doplněk

Příklady jiných metod stanovení početně průměrné molekulové hmotnosti (M_n) polymerů

Gelově permeační chromatografie (GPC) je preferovanou metodou stanovení M_n, zejména tehdy, je-li k dispozici sada standardů, jejichž struktura je srovnatelná se strukturou polymeru. Vyskytnou-li se praktické obtíže při použití GPC nebo očekává-li se, že látka nevyhoví regulativním kritériím na M_n, (což je třeba potvrdit), jsou k dispozici alternativní metody, jako jsou:

1. **Využití koligativních vlastností**

1.1 Ebulioskopie/kryoskopie:

spočívá v měření zvýšení bodu varu (ebulioskopie) nebo snížení bodu tuhnutí (kryoskopie) rozpouštědla po přidání polymeru. Metoda je založena na skutečnosti, že vliv rozpuštěného polymeru na bod varu nebo bod tuhnutí závisí na molekulové hmotnosti polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

1.2 Snížení tlaku par:

spočívá v měření tlaku par zvolené referenční kapaliny před přidáním a po přidání známého množství polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$ (teoretická; v praxi však má omezený význam).

1.3 Membránová osmometrie:

spočívá na principu osmózy, tj. přirozené snahy molekul rozpouštědla proniknout polopropustnou membránou ze zředěného do koncentrovaného roztoku a dosáhnout rovnováhy. Při zkoušce je koncentrace zředěného roztoku nulová, zatímco koncentrovaný roztok obsahuje polymer. Pronikáním rozpouštědla membránou dochází ke tlakovému rozdílu, který závisí na koncentraci a molekulové hmotnosti polymeru (1, 3, 4).

Použitelnost: M_n od 20 000 do 200 000.

1.4 Osmometrie v parní fázi:

spočívá ve srovnání rychlosti vypařování aerosolu čistého rozpouštědla s alespoň třemi aerosoly obsahujícími polymer v různých koncentracích (1, 5, 6).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analýza koncových skupin**

Použití této metody vyžaduje znalost jak celkové struktury polymeru, tak povahy koncových skupin řetězce (které musí být odlišitelné od hlavního řetězce například metodou NMR nebo titrací nebo derivatizací). Stanovení počtu koncových skupin polymeru může vést k hodnotě molekulové hmotnosti (7, 8, 9).

Použitelnost: M_n až do 50 000 (s klesající spolehlivostí).

3. **Literatura**

1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2) Glover, CA., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.

5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19 **OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH**

1. **METODA**

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 119 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkazech.

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Nízká molekulová hmotnost je konvenčně definována jako molekulová hmotnost pod 1 000.

Početně průměrná molekulová hmotnost M_n a hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i x M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kde,

H_i = je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i,

M_i = je molekulová hmotnost frakce polymeru pro retenční objem V_i a n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. K tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylenglykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly (akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoliv. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpce a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různé polystyrenové standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vynesen logaritmus molekulové hmotnosti.

▼B

Obsah molekul o nízké hmotnosti se odečte z této kalibrační křivky. Výpočet může být správný pouze tehdy, je-li odezva nízkomolekulárních látek hmotnostně ekvivalentní polymeru jako celku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava standardních roztoků polystyrenu**

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstřikovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstřikovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstřikované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech 30 × 7,8 mm jsou obvykle 40 až 100 µl. Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 µl. Optimální poměr mezi vstřikovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 **Příprava roztoku vzorku**

Stejné požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 um.

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

▼B

1.6.3 **Korekce na obsah nečistot a přísad**

Korekce obsahu frakce s M < 1 000 v důsledku příspěvku od přítomných nepolymerních specifických složek (např. nečistot a/nebo přísad) je obvykle nezbytná, není-li naměřený obsah < 1 %. Dosáhne se toho přímou analýzou roztoku polymeru nebo eluátu GPC.

V případech, kdy je eluát po průchodu kolonou pro další analýzu příliš zředěný, musí být zkoncentrován. Může být nezbytné odpařit eluát do sucha a opět jej rozpustit. Zkoncentrování eluátu musí být provedeno za podmínek, při nichž je zajištěno, že nedojde ke změnám v eluátu. Zpracování eluátu po GPC závisí na analytické metodě použité ke kvantitativnímu stanovení.

1.6.4 **Přístroje a pomůcky**

Aparatura pro GPC sestává z těchto částí:

— zásobník rozpouštědla,

— odplynovací zařízení (podle potřeby),

— dávkovací čerpadlo,

— tlumič rázů (podle potřeby),

— vstřikovací systém,

— chromatografické kolony,

— detektor,

— průtokoměr (podle potřeby),

— zapisovač,

— nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.5 **Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla**

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.6 **Kolona**

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

▼B

1.6.7 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{nebo} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.8 **Separační účinnost**

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje roh také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibrační křivky. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6,0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kde,

$V_{e,\,Mx}$ = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x

$Ve_{,(10.Mx)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností. Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

kde,

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde,

V_{e1}, V_{e2} = jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

▼B

1.6.9 **Rozpouštědla**

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.10 **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a vedení) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

1.6.11 **Detektor**

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem kyvety detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 μl, s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. K detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. **ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**

2.1 ÚDAJE

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně. Ve všech případech je důležité stanovit také údaje ze slepých pokusů zpracovaných za stejných podmínek jako vzorek.

Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty log M_p (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Při stanovení se část křivky odpovídající molekulovým hmotnostem nižším než 1 000 podle potřeby koriguje na nečistoty a přísady. Eluční křivky se obvykle hodnotí pomocí elektronického zpracování údajů. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Jestliže je v koloně zachycen nerozpustný polymer, je jeho molekulová hmotnost pravděpodobně vyšší než molekulová hmotnost rozpuštěné frakce, a pokud by tato skutečnost nebyla zohledněna, došlo by k nadhodnocení obsahu molekul o nízké hmotnosti. Návod na korigování obsahu molekul o nízké hmotnosti na obsah nerozpuštěného polymeru je uveden v příloze.

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti log M). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),

— popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 **Přístrojové vybavení:**

— zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,

— dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstřikovací systém,

— separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),

— počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),

— informace o symetrii píků,

— teplota kolony, způsob řízení teploty,

— detektor (princip měření, typ, objem kyvety),

— průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),

— systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 **Kalibrace systému:**

— podrobný popis metody použité pro sestrojení kalibrační křivky,

▼B

— informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),

— informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,

— všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:

— název vzorku,

— výrobce vzorku,

— charakteristické hodnoty standardů M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,

— vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,

— hodnota M_p použitá po kalibraci

— eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximu píku,

— hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,

— chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 **Informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností v polymeru:**

— popis metod použitých v analýze a způsobu, jakým byly experimenty provedeny,

— informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností vyjádřeném v hmotnostních procentech celkového vzorku,

— informace o nečistotách, přísadách a jiných nepolymerních podílech vyjádřených v hmotnostních procentech celkového vzorku.

2.2.5 **Hodnocení:**

— hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),

— informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času,

— informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,

— popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,

— příprava a postupy předúpravy vzorku,

— popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,

▼B

— vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),

— pozorované skutečnosti, které vedou k odchylkám od ideálních charakteristik metody GPC,

— podrobný popis všech změn zkušebních postupů,

— podrobnosti o rozsahu chyb,

— jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. **LITERATURA**

1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Doplněk

Korekce obsahu nízkomolekulárních látek na přítomnost nerozpuštěného polymeru

Je-li ve vzorku přítomen nerozpuštěný polymer, dochází ke ztrátě hmotnosti během analýzy GPC. Nerozpuštěné polymery jsou nevratně zachyceny v koloně nebo na filtru při filtraci vzorku, zatímco rozpustný podíl vzorku kolonou projde. V případě, že lze odhadnout nebo změřit přírůstek indexu lomu (dn/dc) polymeru, lze odhadnout ztrátu hmotnosti vzorku na koloně. V takovém případě se korekce provede pomocí externí kalibrace standardními materiály o známé koncentraci a známé hodnotě dn/dc, čímž se kalibruje refraktometr. V příkladě uvedeném dále je jako standard použit poly(methyl-methakrylát) (PMMA).

Při externí kalibraci pro analýzu polyakrylátů se analyzuje metodou GPC standard PMMA známé koncentrace v tetrahydrofuranu a výsledné údaje se použijí pro nalezení konstanty refraktometru podle rovnice:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

K = je konstanta refraktometru (μV/s/ml),

R = je odečet pro standard PMMA (μV/s),

C = je koncentrace standardu PMMA (mg/ml),

V = je vstříknutý objem (ml) a

dn/dc = je přírůstek indexu lomu pro PMMA v tetrahydrofuranu (ml/mg).

Pro standard PMMA jsou typické tyto údaje:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3{,}05 \times 10^{11}$ se poté použije pro výpočet teoretické odezvy detektoru v případě, že detektorem prošlo 100 % vstříknutého polymeru.

▼B

A.20 CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO EXTRAKCI VE VODĚ

1. METODA

Popsaná metoda je replikou revidované verze metody OECD TG 120 (1997). Další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

U určitých polymerů, např. emulzních polymerů, může být před použitím dále popsané metody nezbytná předúprava. Tato metoda není použitelná pro kapalné polymery a pro polymery, které za zkušebních podmínek reagují s vodou.

Není-li metoda použitelná nebo proveditelná, je možné zkoumat chování polymerů při rozpouštění a extrakci jinými metodami. V takových případech by měly být uvedeny všechny podrobnosti použité metody a její zdůvodnění.

1.2 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Chování polymerů při rozpouštění nebo extrakci ve vodném prostředí se zjišťuje baňkovou metodou (viz A.6 Rozpustnost ve vodě, baňková metoda) s úpravou uvedenou dále.

1.4 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Přístroje a pomůcky**

Pro provedení metody je nezbytné toto zařízení:

— drticí zařízení, např. mlýnek pro přípravu částic o známé velikosti,

— třepačka s možností řízení teploty,

— membránový filtrační systém,

— vhodné analytické vybavení,

— normalizovaná síta.

1.5.2 **Příprava vzorku**

Reprezentativní vzorek musí být nejdříve omezen za použití vhodného síta na velikost částic 0,125 až 0,25 mm. Kvůli stálosti vzorku nebo kvůli procesu drcení může být nezbytné chlazení. Kaučukovité materiály mohou být drceny při teplotě kapalného dusíku (1).

Pokud není možné dosáhnout požadované velikosti částic, je třeba přijmout taková opatření, aby byla velikost částic zmenšena co nejvíce; výsledky by měly být zaznamenány. Ve zprávě je nezbytné uvést, jak byl rozdrcený vzorek uchován do provedení zkoušky.

▼B

1.5.3 **Postup**

Do každé ze tří nádob opatřených skleněnými zátkami se naváží po 10 g zkoušené látky a přidá se po 1 000 ml vody. Ukáže-li se zpracování 10 g polymeru neschůdným, mělo by být použito nejbližší vyšší množství, které lze zpracovat, a objem vody by měl být podle toho upraven.

Nádoby se těsně zazátkují a poté se třepou při 20 °C. Měla by být použita třepačka nebo míchačka schopná pracovat při konstantní teplotě. Po 24 hodinách se obsah každé nádoby odstředí nebo zfiltruje a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace polymeru. Nejsou-li k dispozici vhodné analytické metody pro vodnou fázi, lze celkovou rozpustnost nebo extrahovatelnost zhodnotit z hmotnosti sušiny na filtru nebo odstředěné sraženiny.

Obvykle je nezbytné kvantitativně rozlišit nečistoty a přísady na jedné straně a nízkomolekulární podíly na druhé straně. V případě gravimetrického stanovení je také důležité provést slepý pokus bez použití zkoušené látky s cílem zohlednit zbytky pocházející z experimentálního postupu.

Chování při rozpouštění nebo extrakci polymerů ve vodě při 37 °C a pH 2 a 9 může být stanoveno způsobem popsaným v případě provádění experimentu při 20 °C. Hodnot pH lze dosáhnout přidáním buď vhodných pufrů, nebo vhodných kyselin nebo zásad, např. kyseliny chlorovodíkové, kyseliny octové, hydroxidu sodného nebo draselného analytické čistoty nebo NH_3.

V závislosti na použité metodě by měla být provedena jedna nebo dvě zkoušky. Jsou-li k dispozici dostatečně specifické metody pro přímou analýzu vodné fáze na obsah polymeru, měla by stačit jedna zkouška, jak je uvedena výše. Nejsou-li však takové metody k dispozici a zjištění chování polymeru při rozpouštění nebo extrakci je omezeno na nepřímou analýzu stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) ve vodném extraktu, měla by být provedena dodatečná zkouška. Tato dodatečná zkouška by měla být rovněž provedena třikrát, přičemž se použije 10krát menší množství vzorků polymeru a stejné množství vody jako v první zkoušce.

1.5.4 **Analýza**

1.5.4.1 *Zkouška s jednou velikostí vzorku*

Metody pro přímou analýzu složek polymeru ve vodné fázi mohou být k dispozici. V opačném případě lze také zvážit nepřímou analýzu rozpuštěných nebo extrahovaných složek polymeru stanovením celkového obsahu rozpustných složek a provedením korekce na obsah nepolymerních složek.

Analýza vodné fáze na obsah celkového polymerního podílu je možná:

buď dostatečně citlivou metodou, např.

— stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) rozkladem persíranem nebo dichromanem za vzniku CO_2 a následnou IR analýzou nebo chemickou analýzou,

▼B

— atomovou absorpční spektrometrií (AAS) nebo jejím protějškem spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP) pro silikonové polymery nebo polymery obsahující kov,

— UV absorpcí nebo spektrofluorimetrií pro aromatické polymery,

— kapalinovou chromatografií s hmotovým spektrometrem (LC-MS) pro nízkomolekulární vzorky,

nebo vakuovým odpařením vodného extraktu do sucha a spektroskopickou (IR nebo UV atd.) nebo AAS/ICP analýzou zbytku.

Není-li analýza vodné fáze jako takové možná, měl by být vodný extrakt extrahován organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, např. chlorovaným uhlovodíkem. Rozpouštědlo se poté odpaří a zbytek se analyzuje způsobem popsaným výše pro obsah polymeru. Jakékoli složky, které jsou identifikovány jako nečistoty nebo přísady, se odečtou, aby byl stanoven stupeň rozpustnosti samotného polymeru.

Jsou-li přítomna relativně velká množství takových materiálů, může být nezbytné analyzovat zbytek například HPLC nebo GC, aby se odlišily nečistoty z přítomného monomeru nebo deriváty monomeru a aby tak mohl být stanoven skutečný obsah monomeru nebo jeho derivátů.

V některých případech může být postačující pouhé odpaření organického rozpouštědla do sucha a zvážení suchého zbytku.

1.5.4.2 *Zkouška se dvěma různými velikostmi vzorku*

Všechny vodné extrakty se analyzují na celkový obsah organického uhlíku (TOC).

Provede se gravimetrické stanovení nerozpuštěného nebo ne extrahovaného podílu vzorku. Zůstávají-li po odstředění nebo filtraci obsahu každé nádoby usazeny na stěnách nádoby zbytky polymeru, měla by být nádoba oplachována filtrátem, dokud není vyčištěna od všech viditelných zbytků. Poté se filtrát opět odstředí nebo zfiltruje. Zbytky, které zůstanou na filtru nebo v centrifugační kyvetě, se vysuší ve vakuu při 40 °C a zváží. Sušení se provádí do konstantní hmotnosti.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZKOUŠKA S JEDNOU VELIKOSTÍ VZORKU

Pro každou ze tří nádob by měly být uvedeny jednotlivé výsledky a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztažené na objem roztoku (obvykle mg/l) nebo v jednotkách hmotnosti vztažené na hmotnost vzorku polymeru (obvykle mg/g). Kromě toho by měla být uvedena ztráta hmotnosti vzorku (vypočtená jako hmotnost rozpuštěné látky dělená hmotností výchozího vzorku). Měly by být vypočteny relativní směrodatné odchylky (RSD). Měly by být uvedeny jednotlivé hodnoty pro celkovou látku (polymer + hlavní přísady atd.) a pro samotný polymer (tj. po odečtení příspěvku od těchto přísad).

▼B

2.2 ZKOUŠKA SE DVĚMA RŮZNÝMI VELIKOSTMI VZORKU

Pro každý experiment by měly být uvedeny jednotlivé hodnoty TOC ve vodných extraktech obou trojích experimentů a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztažené na objem roztoku (obvykle mg C/l) a rovněž v jednotkách hmotnosti vztažené na hmotnost výchozího vzorku (obvykle mg C/g).

Není-li mezi výsledky pro vysoké a nízké poměry vzorek/voda rozdíl, může to znamenat, že všechny extrahovatelné složky byly skutečně vyextrahovány. V takovém případě obvykle nebývá přímá analýza nezbytná.

Měly by být uvedeny jednotlivé hmotnosti zbytků vyjádřené v procentech počátečních hmotností vzorků. Měly by být vypočteny průměrné hodnoty za celý experiment. Rozdíly mezi 100 % a zjištěnými hodnotami v procentech představují množství rozpustného a extrahovatelného materiálu v původním vzorku vyjádřené v procentech.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

3.1.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty, obsah podílu o nízké molekulové hmotnosti).

3.1.2 **Experimentální podmínky:**

— popis použitých postupů a experimentálních podmínek,

— popis analytických a detekčních metod.

3.1.3 **Výsledky:**

— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/l; jednotlivé a střední hodnoty pro extrakční zkoušky v různých roztocích, rozepsané podle obsahu polymeru, nečistot, přísad atd.,

— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/g polymeru,

— hodnoty TOC ve vodných extraktech, hmotnost rozpuštěné látky a vypočtené procentuální hodnoty (pokud byly stanoveny),

— hodnota pH každého vzorku,

— informace o hodnotách získaných při slepém pokusu,

— podle potřeby upozornění na chemickou nestálost zkoušené látky během zkušebních postupů a analytických postupů,

— všechny informace, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda slouží ke stanovení schopnosti kapalné látky zvyšovat rychlost hoření nebo intenzitu hoření hořlavé látky nebo vytvářet směs s hořlavou látkou, která se po důkladném promísení samovolně vznítí. Je založena na zkoušce OSN pro kapaliny podporující hoření (1) a je jí rovnocenná. Vzhledem k tomu, že tato metoda A.21 byla v prvé řadě zavedena s ohledem na požadavky směrnice nařízení (ES) č. 1907/2006, vyžaduje se srovnání pouze s jednou referenční látkou. Další zkoušení a srovnávání s dalšími referenčními látkami bude nutné, mají-li být výsledky zkoušky použity pro jiné účely ([1]).

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud je z rozboru strukturního vzorce zcela nepochybné, že látka nemůže s jiným hořlavým materiálem reagovat exotermicky.

Před prováděním zkoušky je užitečné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro pevné látky, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo organické peroxidy.

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud jsou pro danou látku již k dispozici výsledky zkoušky OSN pro kapaliny podporující hoření (1).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Průměrnou dobou nárůstu tlaku se rozumí průměr naměřených časových hodnot, v jejichž průběhu dojde v testované směsi k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka se použije 65 % (hmot.) vodný roztok kyseliny dusičné p.a. ([2]).

([1]) Např. pro účely předpisů OSN pro přepravu.
([2]) Koncentrace kyseliny by měla být před zkoušením stanovena titrací.

▼B

Pokud experimentátor předpokládá, že výsledky zkoušky mohou být případně použity pro jiné účely ([1]), je vhodné použít více referenčních látek ([1]).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená kapalina se smísí v poměru 1:1 (hmot.) s vláknitou celulosou a vpraví se do tlakové nádoby. Pokud dojde při mísení nebo plnění k samovolnému vznícení, není třeba ve zkoušce pokračovat.

Pokud k samovolnému vznícení nedojde, provede se celá zkouška. Směs se zahřívá v tlakové nádobě a měří se průměrná doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tato hodnota se porovná s průměrnou dobou pro směs referenční látky (referenčních látek) a celulosy v poměru 1:1.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

V sérii pěti zkoušek jedné látky by neměl být rozdíl jednotlivých výsledků a aritmetického průměru větší než 30 %. Výsledky, které se liší od aritmetického průměru o více než 30 % se nepoužijí, proces mísení a plnění se zlepší a zkoušení zopakuje.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Hořlavá látka*

Jako hořlavý materiál se použije usušená vláknitá celulosa s délkou vlákna od 50 do 250 μm a středním průměrem 25 μm ([2]). Suší se ve vrstvě o tloušťce nejvýše 25 mm 4 hodiny při 105 °C do konstantní hmotnosti a uchovává se v exsikátoru nad vysoušedlem až do vychladnutí a samotného použití. Obsah vlhkosti ve vysušené celulose by měl být nižší než 0,5 %, vztaženo na suchou látku ([3]). Aby bylo této hodnoty dosaženo, doba sušení se podle potřeby prodlouží ([4]). Pro celou zkoušku se použije tatáž šarže celulosy.

([1]) Např. v odkazu 1 se používají 50 % (hmot.) kyselina chloristá a 40 % (hmot.) chlorečnan sodný

([2]) Např. prášková celulosa Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalogové číslo 4021 050.

([3]) Potvrzeno např. titrací podle Karla Fishera

([4]) Tohoto obsahu vlhkosti lze také dosáhnout např. zahříváním při 105 °C za vakua po dobu 24 hodin.

▼B

1.6.1.2 *Zkušební zařízení*

1.6.1.2.1 Tlaková nádoba

Zkouška vyžaduje použití tlakové nádoby. Nádobou je ocelový tlakový válec o délce 89 mm a vnějším průměru 60 mm (viz obrázek 1). Válec je na dvou protilehlých stranách opracován do plochy (v těchto místech je průměr nádobky 50 mm), aby byla usnadněna manipulace při nasazování zažehovací a ventilační zátky. Nádoba má vrtání o světlosti 20 mm a na obou koncích je do hloubky 19 mm rozšířena a opatřena závitem, aby do ní mohla být zavedena trubka odpovídající 1" British Standard Pipe (BSP) nebo jejímu metrickému ekvivalentu. Ve vzdálenosti 35 mm od jednoho konce a v úhlu 90° k nezploštělým stěnám je do válcové stěny tlakové nádoby našroubováno boční rameno pro odvod tlaku. Otvor pro toto rameno je vyvrtán do hloubky 12 mm a opatřen závitem tak, aby vyhovoval závitu 1/2" BSP (nebo metrickému ekvivalentu) na konci bočního ramene. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynotěsnost. Boční rameno přesahuje těleso nádoby o 55 mm a je v něm vyvrtaný kanál o průměru 6 mm. Konec bočního ramene je uvnitř rozšířen a opatřen závitem pro membránové čidlo tlaku. Lze použít jakékoli měřidlo tlaku, které je odolné proti horkým plynům a produktům rozkladu a na nárůst tlaku z 690 na 2 070 kPa reaguje nejpozději do 5 ms.

Konec tlakové nádobky vzdálenější od bočního ramene je opatřen zažehovací zátkou se dvěma elektrodami, přičemž jedna je od zátky izolovaná a druhá je přes zátku uzemněná. Druhý konec tlakové nádoby je uzavřen průtržným diskem (průtržný tlak přibližně 2 200 kPa), který je přidržován zátkou s vrtáním o světlosti 20 mm. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynotěsnost zažehovací zátky. Podstavec (obrázek 2) drží sestavu během používání ve správné poloze. Skládá se obvykle ze základny z měkké oceli o rozměrech 235 mm × 184 mm × 6 mm a ze 185 mm dlouhého dutého hranolu o rozměrech 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Dvě protilehlé strany tělesa jsou vyříznuty tak, aby vznikl podstavec ve tvaru 86 mm dlouhého hranolu na dvou plochých nožičkách. Konce těchto plochých nožiček jsou seříznuty v úhlu 60° vzhledem k horizontální rovině a jsou přivařeny k podstavci. Na horním konci hranolu je vykrojení o šířce 22 mm a hloubce 46 mm, do něhož zapadne boční rameno tlakové nádoby, poté co je do držáku – zažehovací zátkou napřed – zasazena tlaková nádobka. Na vnitřní nižší stranu hranolového držáku je přivařen distanční ocelový kus o šířce 30 mm a tloušťce 6 mm. Tlakovou nádobu na místě zajišťují dva 7 mm postranní křídlové šrouby umístěné v otvorech na protější straně. Na boční díl dna hranolového držáku jsou navařeny dva 12 mm široké a 6 mm silné ocelové pásky, které podepírají tlakovou nádobu zespodu.

▼B

1.6.1.2.2 Zážehový systém

Zážehový systém se skládá z Ni/Cr drátu o délce 25 m, průměru 0,6 mm a odporu 3,85 Ω/m. Drát se pomocí tyčinky o průměru 5 mm navine do tvaru cívky a připojí k elektrodám v zážehové zátce. Dvě možné podoby cívky jsou uvedeny na obrázku 3. Vzdálenost spodní strany nádoby a zážehové cívky by měla být 20 mm. Pokud nelze elektrody nastavit, měly by být konce zážehového drátu mezi cívkou a dnem tlakové nádoby izolovány keramickým pláštěm. Drát se zahřívá konstantním stejnosměrným proudem nejméně 10 A.

1.6.2 **Provedení zkoušky** ([1])

Zařízení vybavené snímačem tlaku a zahřívacím systémem, avšak bez průtržného disku, se vloží do stojanu zážehovou zátkou dolů. Ve skleněné kádince se pomocí skleněného míchadla smíchá 2,5 g kapaliny, která má být zkoušena, s 2,5 g usušené celulosy ([2]). Z bezpečnostních důvodů by měl stát experimentátor při mísení za ochranným štítem. Pokud se směs při mísení nebo plnění vznítí, není třeba ve zkoušce pokračovat. Směs se přidává do tlakové nádoby po malých dávkách a je pěchována poklepem, přičemž je třeba zajistit, aby směs obklopovala zážehovou cívku a byla s ní v těsném kontaktu. Je důležité, aby při plnění nedošlo k deformaci cívky, neboť by to vedlo k chybným výsledkům ([3]). Do tlakové nádoby se vloží průtržný disk a zašroubuje se přidržovací zátka. Naplněná nádoba se vloží do stojanu pro provedení zkoušky průtlakovým diskem nahoru a sestava se umístí do vhodné pancéřované digestoře nebo spalovací komory. Vnější svorky zážehové zátky se připojí ke zdroji napájení o proudu 10 A. Od zahájení mísení do vpuštění proudu do cívky by nemělo uplynout více než 10 minut.

Signál snímače tlaku se zaznamenává vhodným systémem, který umožňuje jak hodnocení, tak trvalý záznam časového průběhu tlaku (např. zapisovač přechodových dějů). Směs se zahřívá do doby, než se roztrhne průtržný disk, nebo po dobu 60 sekund. Pokud se průtržný disk neroztrhne, je třeba před opatrným rozebráním zařízení nechat směs vychladnout, přičemž je třeba dávat pozor na případné zvyšování tlaku. Provede se pět pokusů se zkoušenou a referenční látkou (referenčními látkami). Zaznamená se doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočte se průměrná doba vzestupu tlaku.

V některých případech může látka vykazovat nárůst tlaku (příliš vysoký nebo příliš nízký), který necharakterizuje oxidační vlastnosti látky, a to v důsledku chemické reakce. V takových případech může být nezbytné opakovat zkoušku s inertní látkou, např. s křemelinou (infuzoriovou hlinkou), namísto celulosy, aby se vyjasnil typ reakce.

([1]) Směsi oxidujících látek musí být považovány za látky s možným nebezpečím výbuchu a musí s nimi být nakládáno opatrně.

([2]) V praxi toho lze dosáhnout přípravou směsi látky a celulosy v poměru 1:1 v množství větším než je nezbytné pro pokus; 5 ± 0,1 g takové směsi se poté vpraví do tlakové nádoby. Směs se připravuje čerstvá pro každý pokus.

([3]) Zejména se nesmějí dotýkat sousední závity cívky.

▼B

2. **ÚDAJE**

Doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek). Doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek).

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

Příklady výsledků jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady výsledků [a]

Látka [b]	Průměrná doba nárůstu tlaku pro směs s celulosou v poměru 1:1 (ms)
Dichroman amonný, nasycený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasycený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasycený vodný roztok	4 133
Chloristan lithný, nasycený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasycený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasycený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 [c]
Kyselina chloristá, 50 %	121 [c]
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan stříbrný, nasycený vodný roztok	[d]
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 [c]
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
Inertní látka	
Voda: celulosa	[d]

[a] Klasifikace pro přepravu podle ustanovení OSN je uvedena v literatuře (1).
[b] Nasycený roztok se připraví při 20 °C.
[c] Střední hodnota z mezilaboratorních porovnávacích pokusů.
[d] Maximální tlak 2 070 kPa nebyl dosažen.

▼B

3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

— druh, složení, čistotu atd. zkoušené látky,

— koncentraci zkoušené látky,

— postup sušení použité celulosy,

— vlhkost použité celulosy,

— výsledky měření,

— výsledky zkoušek s inertní látkou, byly-li provedeny,

— vypočtené průměrné doby nárůstu tlaku,

— jakékoli odchylky od této metody s uvedením důvodů,

— všechny další doplňující informace nebo poznámky důležité pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ([1])

Hodnocení výsledků se zakládá na těchto skutečnostech:

a) na tom, zda došlo k samovolnému vznícení směsi zkoušené látky a celulosy,

b) a na porovnání průměrné doby nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa s dobou, kterou vykazuje referenční látka (referenční látky).

Kapalina se považuje za oxidující, pokud:

a) se směs látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) samovolně vznítí, nebo

b) je průměrná doba nárůstu tlaku směsi látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) rovna průměrné době nárůstu tlaku směsi 65 % (hmot.) vodného roztoku kyseliny dusičné a celulosy nebo kratší.

S cílem vyhnout se falešně pozitivnímu výsledku je při analýze výsledků potřeba zohlednit také výsledky zkoušení látky s inertním materiálem.

([1]) Interpretace výsledků získaných za použití více refernečních látek podle předpisů OSN je popsána v literatuře (1).

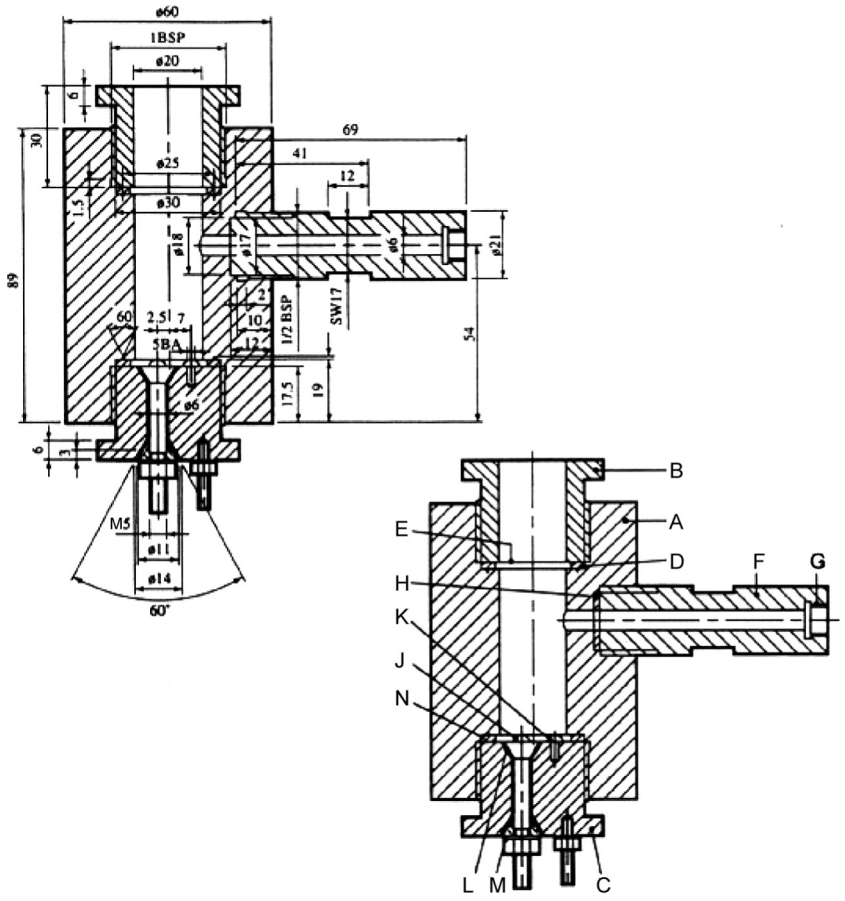
▼B

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC. 10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázek 1

Tlaková nádoba



(A)Těleso tlakové nádoby

(B) Zátka přidržující průtržný disk

(C) Zažehovací zátka

(D) Těsnění z měkkého olova

(E) Průtržný disk

(F) Boční rameno

(G) Čelo čidla tlaku

(H) Těsnění

(J)Izolovaná elektroda

(K) Uzemněná elektroda

(L) Izolace

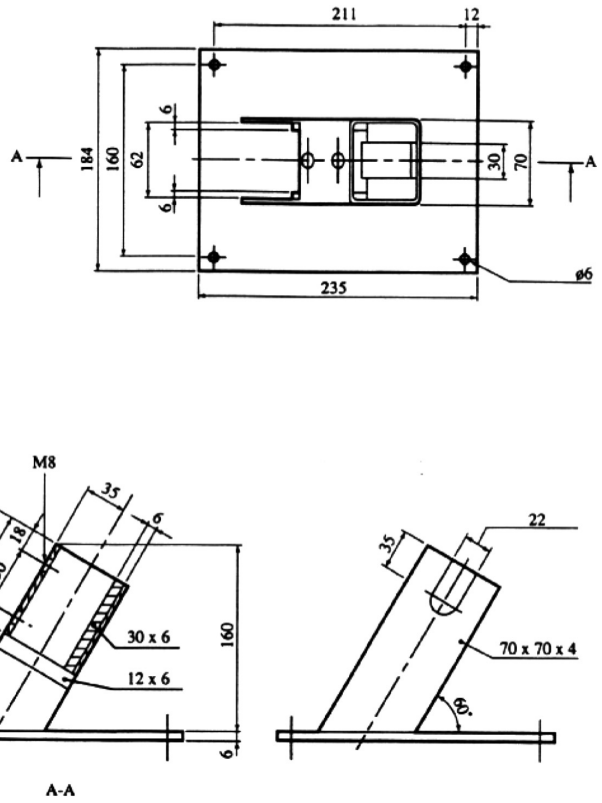
(M) Ocelový kužel

(N) Těsnicí spára

▼B

Obrázek 2

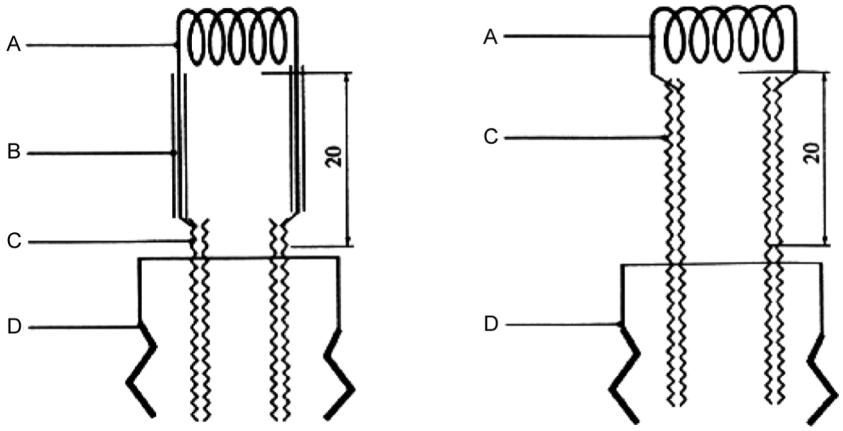
Podstavec



Obrázek 3

Zážehový systém

(A) Zážehová cívka (B) Izolace (C) Elektrody (D) Zážehová zátka



Poznámka: může být použito kterékoli z těchto dvou uspořádání.

▼M1

A.22 DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda popisuje postup měření délkově váženého středního geometrického průměru (DVGSP) umělých minerálních vláken (UMV). Jelikož DVGSP statistického souboru bude s pravděpodobností 95 % mezi hladinami významnosti 95 % (DVGSP ± dvě střední směrodatné chyby) vzorku, ohlášená hodnota (testová hodnota) bude nižší hladina významnosti 95 % vzorku (tj. DVGSP – 2 dvě střední směrodatné chyby). Metoda je založena na aktualizaci (červen 1994) návrhu průmyslového postupu HSE (Výkonný výbor pro zdraví a bezpečnost) dohodnutého na schůzce HSE a ECFIA (Evropská asociace odvětví keramických vláken) v Chesteru dne 26. září 1993 a vyvinutého druhou mezilaboratorní zkouškou (1, 2). Tato měřicí metoda může být použita pro charakterizaci průměru vláken sypkých látek či výrobků obsahujících UMV, včetně vysokotavných keramických vláken (VKV), umělých skelných vláken (USV), krystalických a polykrystalických vláken.

Délkové vážení je způsobem kompenzace vlivu rozlomení dlouhých vláken při odběru vzorků či při manipulaci s vlákny na rozložení jejich průměru. Pro měření rozložení velikosti průměrů UMV jsou použita geometrická statistická data (geometrický průměr), jelikož tyto průměry obvykle mají rozložení velikosti blížící se normálnímu.

Měření délky a průměru je jak únavné, tak dlouhé, ovšem pokud se měří pouze ta vlákna, která se dotýkají nekonečně tenké čáry na zorném poli rastrovacího elektronového mikroskopu, pak je pravděpodobnost výběru daného vlákna přímo úměrná jeho délce. Jelikož tím se zohledňuje délka při délkově vážených výpočtech, jediné vyžadované měření je měření průměru a DVGSP-2SE může být vypočten uvedeným způsobem.

1.2 DEFINICE

Částice: objekt s poměrem délky k šířce menším než 3:1.

Vlákno: objekt s poměrem délky k šířce (charakteristický poměr) nejméně 3:1.

1.3 PLATNOST A OMEZENÍ

Metoda je určena pro pohled na rozdělení průměrů o středním průměru mezi 0,5 μm a 6 μm. Větší průměry mohou být měřeny pomocí menších zvětšení rastrového elektronového mikroskopu, ale tato metoda bude stále více limitována vzhledem k rozdělení jemných vláken a je-li střední průměr menší než 0,5 μm, doporučujeme měření transmisním elektronovým mikroskopem (TEM).

▼M1

1.4 Princip měřicí metody

Z vláknové pokrývky či z volných sypkých vláken se odebere několik reprezentativních jádrových vzorků. Sypká vlákna jsou délkově omezena pomocí procesu drcení a reprezentativní podíl vzorku se rozpustí ve vodě. Poměrné podíly se vyloučí a přefiltrují přes polykarbonátový filtr o rozměrech pórů 0,2 μm a připraví se na pozorování pomocí technik rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Průměry vláken se měří při zvětšení obrazovky × 10 000 nebo vyšším ([1]) pomocí čárové zadržovací metody, aby se získal nezaujatý odhad středního průměru. Vypočte se nižší hladina významnosti 95 % (na základě jednostranného testu), a tím se získá odhad nejnižších hodnot geometrického středního průměru vláken materiálu.

1.5 Popis měřicí metody

1.5.1 **Bezpečnostní opatření**

Je nutno minimalizovat vystavení osob zvířeným vláknům a při manipulaci se suchými vlákny je nutno používat digestoř či suchou skříň. Je nutno periodicky provádět monitoring osobní expozice pro určení efektivity kontrolních metod. Při manipulaci s UMV je nutno nosit jednorázové rukavice pro omezení podráždění kůže a pro zabránění křížové kontaminaci.

1.5.2 **Přístroje/zařízení**

— lis a lisovadla (schopná vyvinout tlak 10 MPa),

— polykarbonátové filtry s kapilárními póry o velikosti 0,2 μm (průměr 25 mm),

— membránový filtr z esteru buničiny o rozměru pórů 5 μm jako filtr záložní,

— skleněný filtrační přístroj (či použitelné filtrační systémy) pro filtry o průměru 25 cm (např. skleněná mikroanalytická sada Millipore typ XX10 025 00),

— čerstvá voda destilovaná přes filtr o rozměru pórů 0,2 μm pro odstranění mikroorganismů,

— katodový rozprašovač s anodou ze zlata či ze zlata/palladia,

— rastrovací elektronový mikroskop schopný rozlišení až 10 nm a pracující při zvětšení × 10 000,

— různé: stěrky, skalpel typu 24, pinzeta, tubusy SEM, uhlíkové lepidlo či uhlíková lepící páska, stříbrná tyčinka,

— ultrazvuková sonda či ultrazvuková lázeň na desce laboratorního stolu,

— odběrač vzorků sedimentu či korkovrt pro odebírání jádrových vzorků z pokrývky UMV.

([1]) Tato hodnota zvětšení je uvedena pro vlákna o průměru 3 μm, pro vlákna o průměru 6 μm je vhodnější zvětšení × 5 000.

▼M1

1.5.3 **Postup měření**

1.5.3.1 *Odběr vzorků*

U pokrývek a roun se používá odběrač vzorků velikosti 25 mm či korkovrt pro odebírání vzorků z řezu. Vzorky by měly být rovnoměrně rozprostřeny po šířce a z malé délky pokrývky, nebo by měly být odebrány z náhodných ploch, je-li k dispozici pokrývka o velké délce. Stejné zařízení může být použito pro odběr náhodných vzorků z volných vláken. Je-li to možné, mělo by být odebráno šest vzorků tak, aby byly zohledněny prostorové odchylky v sypkém materiálu.

Těchto šest jádrových vzorků je nutno rozdrtit v lisovadle o průměru 50 mm tlakem 10 MPa. Materiál se rozmíchá stěrkou a znovu se stlačí tlakem 10 MPa. Poté se materiál vyjme z lisovadla a umístí v utěsněné skleněné láhvi.

1.5.3.2 *Příprava vzorku*

Je-li to nutné, organické pojivo může být odstraněno umístěním vláken do pece o teplotě 450 °C po dobu jedné hodiny.

Vytvarujte vzorek do kužele a rozčtvrťte jej (to by mělo být provedeno uvnitř prachové skříně).

Přidejte stěrkou malé množství vzorku (< 0,5 g) do 100 ml čerstvé destilované vody, která byla přefiltrována přes membránový filtr 0,2 μm (je možno použít jiný zdroj velmi čisté vody, ukáže-li se být uspokojivý). Řádně rozmíchejte vzorek pomocí ultrazvukové sondy provozované s výkonem 100 W a vyladěné tak, aby se objevila kavitace (není-li sonda k dispozici, postupujte takto: opakovaně vzorek protřepte a otočte jej na dobu 30 sekund; po dobu pěti minut vystavte vzorek ultrazvuku v ultrazvukové lázni; poté opět několikrát protřepte a otočte vzorek po dobu dalších 30 sekund).

Ihned po promíchání vláken odeberte několik poměrných dílů (např. tři poměrné části o 3, 6 a 10 ml) pomocí široké pipety (o objemu 2–5 ml).

Vakuově přefiltrujte každý poměrný díl přes polykarbonátový filtr 0,2 μm s pomocí podpůrného filtru MEC o velikosti pórů 5 μm pomocí skleněného filtračního tunelu 25 mm s válcovou nádrží. Přibližně 5 ml filtrované destilované vody by mělo být umístěno do tunelu a poměrný díl by měl být pomalu pipetován do vody, okraj pipety se drží pod prohnutou čočkou. Po pipetování musí být pipeta a nádrž řádně propláchnuta, jelikož tenká vlákna mají snahu ulpívat dále na povrchu.

Opatrně odstraňte filtr a oddělte jej od podpůrného filtru před jeho umístěním do obalu za účelem jeho vysušení.

▼M1

Uřízněte čtvrtinu či polovinu filtrované části filtrovaného depozitu pomocí skalpelu typu 24 trhnutím. Opatrně připojte odříznutou část k bloku SEM pomocí lepící uhlíkové pásky či uhlíkového lepidla. Je nutno použít alespoň na třech místech stříbrnou tyčinku pro zlepšení elektrického kontaktu na okrajích filtru a bloku. Je-li lepidlo/stříbrná tyčinka suchá, katodově rozprašte cca 50 nm zlata či zlata/palladia na povrch depozitu.

1.5.3.3 *Kalibrace a provoz SEM*

1.5.3.3.1 K a l i b r a c e

Kalibrace SEM by měla být zkontrolována minimálně jednou za týden (ideálně jednou denně) pomocí certifikované kalibrační mřížky. Kalibrace musí být kontrolována vůči certifikovanému standardu a není-li naměřená hodnota (SEM) v rozsahu ±2 % hodnoty certifikované, potom musí být kalibrace SEM seřízena a znovu zkontrolována.

SEM by měl být schopen rozlišit alespoň minimální viditelný průměr 0,2 μm pomocí reálné vzorkovací matice při zvětšení × 2 000.

1.5.3.3.2 P r o v o z

SEM by měl být provozován při zvětšení 10 000 ([1]) za podmínek, které dávají dobré rozlišení při přijatelném snímku při pomalých snímacích rychlostech např. 5 sekund na rámec. I když se provozní požadavky různých SEM mohou lišit, obecně by mělo být použito urychlovací napětí 5–10 keV s nastavením malé velikosti bodu a krátkou pracovní vzdáleností; tím se získá nejlepší viditelnost a rozlišení s materiály o relativně nízkých atomových hmotnostech. Při provádění lineárního příčného pohybu musí být použit sklon 0° pro minimalizaci přeostření, nebo má-li SEM eucentrickou fázi, musí být použita eucentrická pracovní vzdálenost. Menší zvětšení může být použito, neobsahuje-li materiál vlákna o malých průměrech a průměry vláken jsou velké (> 5 μm)

1.5.3.4 *Třídění dle rozměrů*

1.5.3.4.1 P o z o r o v á n í p ř i m a l é m z v ě t š e n í p r o v y h o d n o c e n í v z o r k u

Zpočátku by měl být vzorek pozorován při malém zvětšení pro ujištění se o rozdrcení velkých vláken a pro vyhodnocení hustoty vláken. V případě velkého rozdrcení je doporučeno připravit nový vzorek.

Kvůli statistické přesnosti je nezbytné změřit minimální počet vláken a může se zdát být výhodná vysoká hustota vláken, jelikož pozorováním prázdných polí ztrácíme čas a nijak k analýze nepřispíváme. Ovšem při přetížení filtru je obtížné změřit všechna měřitelná vlákna a jelikož malá vlákna mohou být zakryta vlákny většími, mohou být vynechána.

([1]) U vláken 3 μm viz předchozí poznámka.

▼**M1**

Je-li hustota vláken větší než 150 vláken na milimetr lineárního příčného posuvu, může dojít k nežádoucímu vlivu nadhodnocení DVGSP. Na druhé straně malá koncentrace vláken zvyšuje dobu analýzy a často je nákladově efektivní připravit vzorek v hustotou vlákna blíže hodnotě optimální, než zůstat u počítání vláken o menších koncentracích. optimální hustota vláken by měla dávat průměrně jedno či dvě počítatelná vlákna na pole z záběru o zvětšení 5 000. Nicméně optimální hustota bude záviset na velikosti (průměru) vláken, takže je nezbytné, aby obsluha používala odborný úsudek za účelem rozhodnutí, zda je hustota vláken blízko hodnotě optimální či nikoliv.

1.5.3.4.2 Délkové vážení průměrů vláken

Pouze ta vlákna, která se dotýkají (nebo kříží) (nekonečně) tenkou čáru nakreslenou na obrazovce SEM, se započítávají. Z tohoto důvodu je přes střed obrazovky nakreslena horizontální (či vertikální) čára.

Alternativně může být ve středu obrazovky umístěn jediný bod a zahájí se spojité snímání v jednom směru přes filtr. Každé vlákno o charakteristickém poměru větším než 3:1 dotýkající se při procházející tímto bodem má změřený a zaznamenaný průměr.

1.5.3.4.3 Třídění vláken

Doporučuje se měření minimálně 300 vláken. Každé vlákno je měřeno pouze jednou v bodě průsečíku s čárou či bodem nakresleným na snímku (nebo blízko průsečíku, jsou-li okraje vlákna zakrytá). Jestliže se objeví vlákna s nerovnoměrným průřezem, je nutno použít měření reprezentující střední průměr vlákna. Je nutno dbát na definování okraje a měřit nejkratší vzdálenost mezi okraji vlákna. Třídění může být prováděno on-line, nebo off-line na uložených snímcích či fotografiích. Doporučeny jsou poloautomatické snímkovací měřicí systémy, které stahují data přímo do tabulky, jelikož šetří čas, eliminují chyby v přepisech a mohou být zautomatizovány výpočty.

Konce dlouhých vláken by měla být zkontrolovány při malém zvětšení, aby bylo zajištěno, že se nepřesunou zpět do měřicího zorného pole a že budou měřeny pouze jednou.

2. **DATA**

2.1 NAKLÁDÁNÍ S VÝSLEDKY

Průměry vláken obvykle nemají normální rozdělení. Ovšem provedením logaritmické transformace je možno získat rozdělení, které se blíží normálnímu.

Vypočtěte aritmetický průměr (střední (mean) lnD) a standardní odchylku (SD_{lnD}) logaritmem o základu e hodnoty (lnD) průměrů vláken (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\Sigma \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardní odchylka je dělena druhou odmocninou počtu měření (n), čímž získáme střední směrodatnou chybu (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odečtěte od průměrné hodnoty dvojnásobek střední směrodatné chyby a vypočtěte exponenciál této hodnoty (průměr mínus dvě střední směrodatné chyby), což dává střední geometrickou hodnotu mínus dvě geometrické směrodatné chyby.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ZPRÁVY**

ZPRÁVA O MĚŘENÍ

Zpráva o měření by měla obsahovat minimálně tyto informace:

— hodnotu DVGSP-2SE,

— veškeré odchylky a zejména ty, které mohou mít vliv na přesnost výsledků, s patřičným odůvodněním.

4. **LITERATURA**

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Únor 1999.

(2) G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Projekt R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (OKTAN-1-OL/VODA): METODA POMALÉHO MÍCHÁNÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) č. 123 (2006). Metodou pomalého míchání byly přesně stanoveny hodnoty rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda (P_{ow}) až po hodnotu log P_{ow} = 8,2 (1). Proto je vhodným experimentálním postupem pro přímé stanovení P_{ow} vysoce hydrofobních látek.

2. Dalšími metodami stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda (P_{ow}) jsou metoda „třepací lahve“ (2) a stanovení P_{ow} z retenčního chování při reverzní fázi HPLC (3). Při metodě „třepací lahve“ může dojít k artefaktům v důsledku přenosu mikrokapiček oktanolu do vodné fáze. Při vzrůstajících hodnotách P_{ow} vede přítomnost těchto kapiček ve vodné fázi k zvyšujícímu se nadhodnocení odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě. Proto je její použití omezeno na látky s log P_{ow} < 4. Druhá metoda závisí na spolehlivosti údajů přímo stanovených hodnot P_{ow}, které se používají ke kalibraci vztahu mezi retenčním chováním při HPLC a naměřenými hodnotami P_{ow}. Pro stanovení rozdělovacích koeficientů oktan-1-ol/voda u ionizovatelných látek byla k dispozici pracovní verze pokynů OECD (4), ta se však již nemá nadále používat.

3. Tato zkušební metoda byla vyvinuta v Nizozemsku. Přesnost zde popisovaných metod byla validována a optimalizována ve validační studii mezilaboratorních testů, které se zúčastnilo 15 laboratoří (5).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Význam a použití

4. U inertních organických látek byl zjištěn velmi významný vztah mezi rozdělovacími koeficienty oktan-1-ol/voda (P_{ow}) a jejich bioakumulací v rybách. Dále bylo prokázáno, že P_{ow} koreluje s toxicitou pro ryby a rovněž se sorpcí chemických látek na pevné látky, např. půdu a sedimenty. V literatuře je uveden rozsáhlý přehled těchto vztahů (6).

5. Byla stanovena široká škála vztahů mezi rozdělovacím koeficientem oktan-1-ol/voda a dalšími vlastnostmi látek s významem pro environmentální toxikologii a chemii. V důsledku toho se stal rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda klíčovým parametrem při posuzování rizik chemických látek pro životní prostředí a rovněž při odhadu osudu chemických látek v životním prostředí.

Oblast použití

6. Má se za to, že experiment používající pomalé míchání omezuje tvorbu mikrokapiček z kapiček oktan-1-olu ve vodné fázi. Proto nedochází k nadhodnocení odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodné fázi v důsledku molekul zkoušené chemické látky asociovaných na tyto kapičky. Metoda pomalého míchání je proto vhodná zejména k stanovení P_{ow} u látek s předpokládanou hodnotou log P_{ow} = 5 a vyšší, u nichž má metoda třepací lahve (2) tendenci vést k chybným výsledkům.

▼M4

DEFINICE A JEDNOTKY

7. Rozdělovací koeficient látky pro rozdělení mezi vodu a lipofilní rozpouštědlo (oktan-1-ol) charakterizuje rovnovážný stav distribuce chemické látky mezi těmito dvěma fázemi. Rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda (P_{ow}) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací zkoušené chemické látky v oktan-1-olu nasyceném vodou (C_o) a ve vodě nasycené oktan-1-olem (C_w).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Protože se jedná o podíl dvou koncentrací, je bezrozměrný. Nejčastěji se udává jako dekadický logaritmus (log P_{ow}). Hodnota P_{ow} závisí na teplotě a vykazované údaje by měly zahrnovat i teplotu měření.

PODSTATA METODY

8. Pro stanovení rozdělovacího koeficientu se musí vzájemně ekvilibrovat voda, oktan-1-ol a zkoušená chemická látka při konstantní teplotě. Poté se stanoví koncentrace zkoušené chemické látky v obou fázích.

9. Potíže při provádění experimentu spojené s tvorbou mikrokapiček během experimentu používajícího metodu třepací lahve lze omezit zde navrhovanou metodou pomalého míchání. Při experimentu používajícím metodu pomalého míchání se rovnováhy mezi vodou, oktan-1-olem a zkoušenou chemickou látkou dosáhne v termostatovaném míchaném reaktoru. Výměna mezi fázemi je urychlena mícháním. Při míchání dochází jen k omezeným turbulencím, což zlepšuje výměnu mezi oktan-1-olem a vodou bez současné tvorby mikrokapiček (1).

POUŽITELNOST ZKOUŠKY

10. Protože přítomnost jiných látek než zkoušené chemické látky může ovlivnit aktivitní koeficient zkoušené chemické látky, měla by se ověřit čistota zkoušené chemické látky. Pro stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda by se měla použít látka o nejvyšší čistotě, která je komerčně dostupná.

11. Tato metoda se používá u čistých látek, které nedisociují ani neasociují a nejsou výrazně povrchově aktivní. U takových látek a směsí je možné metodu použít ke stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda. Pokud se tato metoda používá u směsí, jsou stanovené rozdělovací koeficienty oktan-1-ol/voda podmíněné a závisejí na chemickém složení zkoušené směsi a na složení elektrolytu použitého jako vodná fáze. Pokud se podniknou doplňující kroky, lze tuto metodu použít rovněž pro disociující nebo asociující sloučeniny (odstavec 12).

12. Vzhledem k mnohonásobným rovnovážným stavům ve vodě a oktan-1-olu při rozdělování disociujících látek, jako jsou organické kyseliny a fenoly, organické báze a látky na organokovové sloučeniny, je rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda podmíněnou konstantou, která výrazně závisí na složení elektrolytu (7)(8). Stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda proto vyžaduje, aby bylo pH a složení elektrolytu v experimentu regulované a aby se zaznamenalo. Při hodnocení těchto rozdělovacích koeficientů je třeba vycházet z odborného posudku. S pomocí hodnoty disociační(ch) konstant(y) se musí zvolit vhodné hodnoty pH, aby se stanovil rozdělovací koeficient pro každý ionizační stav. Při zkoušení organokovových sloučenin se musí použít nekomplexující pufry (8). Vezmou-li se v úvahu stávající znalosti z oblasti chemie vodných roztoků (konstanty stability komplexu, disociační konstanty), měly by se zvolit experimentální podmínky takovým způsobem, aby bylo možno odhadnout, jaké formy vytvoří zkoušená chemická látka ve vodné fázi. Iontová síla by měla být ve všech experimentech identická díky použití základního elektrolytu.

▼M4

13. Provádění této zkoušky může být problemetické v případě látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokým P_{ow}, protože jejich koncentrace ve vodě je tak nízká, že je obtížné ji přesně stanovit. Tato zkušební metoda uvádí pokyny, jak tento problém řešit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

14. Chemická činidla by měla mít analytickou nebo vyšší čistotu. Doporučuje se použít neznačené zkoušené chemické látky se známým chemickým složením a pokud možno o čistotě alespoň 99 % nebo radioizotopově značené zkoušené chemické látky se známým chemickým složením a radiochemickou čistotou. V případě značek s krátkým eliminačním poločasem by se měly provést korekce na rozpad. V případě radioizotopově značených zkoušených látek by se měla použít chemická specifická analytická metoda k zajištění toho, aby naměřená radioaktivita přímo souvisela se zkoušenou chemickou látkou.

15. Odhad hodnoty log P_{ow} lze vypočítat pomocí komerčně dostupného softwaru pro odhad hodnoty log P_{ow} nebo použitím podílu rozpustností v obou rozpouštědlech.

16. Před provedením experimentu používajícím pomalé míchání k stanovení hodnoty P_{ow} je třeba mít k dispozici následující informace o zkoušené chemické látce:

a) strukturní vzorec;

b) vhodné analytické metody k stanovení koncentrace látky ve vodě a oktan-1-olu;

c) disociační konstanta (konstanty) ionizovatelných látek (Pokyny OECD 112 (9));

d) rozpustnost ve vodě (10);

e) abiotická hydrolýza (11);

f) snadná biologická rozložitelnost (12);

g) tlak par (13).

POPIS METODY

Vybavení a aparatura

17. Je třeba standardní laboratorní vybavení, zejména:

— magnetické míchačky a magnetické míchací tyčinky s teflonovým povlakem k míchání vodné fáze,

— analytické přístroje vhodné k stanovení koncentrace zkoušené chemické látky v předpokládaném rozmezí koncentrací,

— míchací nádoba s kohoutem v dolní části. V závislosti na odhadované hodnotě log P_{ow} a mezi stanovitelnosti (LOD) zkoušené sloučeniny se musí zvážit použití reakční nádoby stejného tvaru o objemu větším než jeden litr, aby bylo možno získat dostatečný objem vody pro chemickou extrakci a analýzu. Koncentrace ve vodném extraktu tak budou vyšší a tím bude i k analytické stanovení spolehlivější. V příloze 1 naleznete tabulku, v níž jsou uvedeny odhady minimálního potřebného objemu, LOD sloučeniny, její odhadované hodnoty log P_{ow} a její rozpustnost ve vodě. Tabulka je založena na vztahu mezi hodnotou log P_{ow} a poměrem rozpustností v oktanolu a ve vodě, jak jej uvádí Pinsuwan*et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

kde

$SR = S_{oct}/S_w$ (v jednotkách molární koncentrace),

a na vztahu pro odhad rozpustnosti ve vodě, jak jej uvádí Lyman (15). Hodnoty rozpustnosti ve vodě vypočítané podle rovnice uvedené v příloze 1 se musí považovat za první odhad. Je třeba poznamenat, že uživatel může k získání odhadu rozpustnosti ve vodě použít bez omezení jakýkoli vztah, o němž se má za to, že lépe vyjadřuje vztah mezi hydrofobicitou a rozpustností. Například u sloučenin v pevném skupenství se doporučuje zahrnout do odhadu rozpustnosti bod tání. V případě, že se použije pozměněný vzorec, je třeba se ujistit, že vzorec pro výpočet rozpustnosti v oktanolu i nadále platí. V dodatku 2 je uveden schematický nákres míchací nádoby se skleněným pláštěm o objemu asi jeden litr. Proporce nádoby uvedené v dodatku 2 se osvědčily jako vhodné a měly by se zachovat i při použití aparatury jiné velikosti,

— během experimentu používajícího pomalé míchání je nezbytné udržovat konstantní teplotu.

18. Nádoby by měly být vyrobeny z inertního materiálu, aby byla adsorpce na povrch nádoby zanedbatelná.

Příprava roztoků ke zkoušce

19. Stanovení hodnoty P_{ow} by se mělo provádět s oktan-1-olem o nejvyšší čistotě, který je komerčně dostupný (nejméně 99 %). Doporučuje se přečištění oktan-1-olu extrakcí kyselinou, zásadou a vodou s následným vysušením. Kromě toho se může oktan-1-ol přečistit destilací. Purifikovaný oktan-1-ol se použije k přípravě standardních roztoků zkoušené chemické látky. Při stanovení hodnoty P_{ow} by se měla používat voda destilovaná ve skleněné nebo křemenné aparatuře nebo získaná z purifikačního systému nebo se může použít voda v čistotě pro HPLC. U destilované vody je nutná filtrace přes 0,22μm filtr a měly by se zahrnout slepé pokusy za účelem ověření, že koncentrované extrakty neobsahují žádné nečistoty, které by mohly interferovat se zkoušenou chemickou látkou. Používá-li se filtr ze skleněných vláken, měl by se vyčistit vystavením teplotě 400 °C po dobu nejméně tří hodin.

20. Obě rozpouštědla se před experimentem vzájemně nasytí tím, že uvedením do rovnovážného stavu v dostatečně velké nádobě. Dosáhne se toho pomalým mícháním tohoto dvoufázového systému po dobu dvou dnů.

21. Zvolí se vhodná koncentrace zkoušené chemické látky a látka se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou). Rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda se musí stanovit v ředěných roztocích látky v oktan-1-olu a vodě. Proto by koncentrace zkoušené chemické látky neměla přesáhnout 70 % její rozpustnosti, přičemž maximální koncentrace v každé fázi by měla být 0,1 M (1). Roztoky oktan-1-olu použité v experimentu nesmějí obsahovat suspendované pevné částečky zkoušené chemické látky.

22. Vhodné množství zkoušené chemické látky se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou). Pokud je odhadovaná hodnota log P_{ow} větší než pět, je třeba pečlivě zajistit, aby roztoky oktan-1-olu používané v experimentu neobsahovaly suspendované pevné částečky zkoušené chemické látky. K tomu je třeba použít u chemických látek s odhadovanou hodnotou log $P_{ow} > 5$ tento postup:

— zkoušená chemická látka se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou),

▼M4

— roztok se nechá po dostatečně dlouhou dobu ustálit, aby se suspendovaná pevná látka usadila. V průběhu usazování se sleduje koncentrace zkoušené chemické látky,

— poté, co naměřené koncentrace látky v roztoku oktan-1-olu dosáhnou stálých hodnot, naředí se zásobní roztok vhodným objemem oktan-1-olu,

— koncentrace ředěného zásobního roztoku se změří. Jestliže naměřená koncentrace odpovídá ředění, může se naředěný zásobní roztok použít v experimentu s pomalým mícháním.

Extrakce a analýza vzorků

23. Stanovení zkoušené chemické látky by se mělo provádět validovanou analytickou metodou. Experimentátoři musí podat důkaz o tom, že se koncentrace látky v oktan-1-olové fázi nasycené vodou a rovněž ve vodné fázi nasycené oktan-1-olem během experimentu nacházejí nad mezí stanovitelnosti použitých analytických postupů. V případě, že jsou nutné extrakční metody, musí se před experimentem stanovit analyticky výtěžky zkoušené chemické látky z vodné fáze a z oktan-1-olové fáze. Analytický signál se musí korigovat s ohledem na slepé vzorky a je třeba zajistit, aby se jeden vzorek nemohl kontaminovat analytem z jiného vzorku.

24. Před analýzou bude pravděpodobně nutné provést extrakci vodné fáze organickým rozpouštědlem a zakoncentrování extraktu, protože koncentrace hydrofobních zkoušených látek ve vodné fázi je poměrně nízká. Ze stejného důvodu je nezbytné snížit případné koncentrace slepých vzorků. Proto je třeba použít rozpouštědla o vysoké čistotě, nejlépe rozpouštědla pro analýzu reziduí. Kromě toho může použití předem pečlivě vyčištěného(např. umytím v rozpouštědle nebo pečením při zvýšené teplotě) skla pomoci zabránit křížové kontaminaci.

25. Odhad hodnoty log P_{ow} lze získat pomocí programu pro odhady nebo na základě odborného posudku. Je-li tato hodnota vyšší než šest, je třeba pečlivě sledovat korekce na slepé vzorky a případnou kontaminaci analytu. Podobně, přesáhne-li odhadovaná hodnota log P_{ow} šest, je povinné použití náhradního standardu pro korekci na výtěžnost, aby bylo možné dosáhnout vysokých faktorů zakoncentrování. K odhadu hodnoty log P_{ow} je komerčně dostupná řada počítačových programů ([1]), např. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) a ACD log P (19). V literatuře (20–22) jsou uvedeny popisy metod odhadu.

26. Pomocí schválených metod se určí meze stanovitelnosti (LOQ) zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě. Na základě empirie lze mezní hodnotu kvantitativní stanovitelnosti dané metody určit jako koncentraci látky ve vodě nebo oktan-1-olu, při které je poměr signálu k šumu deset. Měla by se zvolit vhodná metoda extrakce a předběžného zakoncentrování a také by se měly specifikovat analyticky výtěžky. Zvolí se vhodný faktor zakoncentrování, aby se při analytickém stanovení získal signál požadované velikosti.

([1]) Tyto informace jsou poskytovány pouze pro potřebu uživatelů. Mohou se použít i jiné rovnocenné počítačové programy, pokud lze prokázat, že vedou ke stejným výsledkům.

▼M4

27. Na základě parametrů analytické metody a očekávaných hodnot koncentrace se určí přibližná velikost vzorku nezbytného pro přesné stanovení koncentrace sloučeniny. Vodné vzorky by neměly být příliš malé, protože by analytický signál nemusel být dostatečný. Zároveň by neměly být vodné vzorky příliš velké, aby celkové množství vody stačilo na minimální počet požadovaných analýz (n = 5). V dodatku 1 je uvedeno, že minimální objem vzorku závisí na objemu nádoby, mezi stanovitelnosti zkoušené chemické látky (LOD) a na rozpustnosti zkoušené chemické látky.

28. Kvantifikace zkoušené chemické látky se provádí porovnáním s kalibračními křivkami příslušné sloučeniny. Koncentrace v analyzovaných vzorcích musí být doplněny koncentracemi standardů v závorkách.

29. U zkoušených látek s odhadovanou hodnotou log P_{ow} větší než šest je třeba přidat k vodnému vzorku před extrakcí náhradní standard za účelem registrace ztrát během extrakce a zakoncentrování vodných vzorků. Pro přesnou korekci na výtěžnost musí mít náhradní standardy vlastnosti velmi podobné vlastnostem zkoušené chemické látky nebo identické vlastnosti. K tomuto účelu se přednostně používají (stabilní) izotopově značené analogy dotčených látek (například značené deuteriem nebo izotopy ^{13}C). Není-li možno použít značení stabilními izotopy, tj. ^{13}C nebo ^{2}H, mělo by se prokázat pomocí spolehlivých údajů z literatury, že jsou fyzikálně-chemické vlastnosti náhradního standardu velmi podobné vlastnostem zkoušené chemické látky. Během extrakce typu kapalina-kapalina v případě vodné fáze mohou vznikat emulze. Lze je omezit přidáním soli a ponecháním emulze, aby se přes noc usadila. Je třeba uvést metody použité pro extrakci a předběžné zakoncentrování vzorků.

30. Vzorky odebrané z oktan-1-olové fáze se mohou před analýzou v případě potřeby naředit vhodným rozpouštědlem. Dále se použití náhradních standardů pro korekci na výtěžnost doporučuje u látek, u nichž experimenty stanovující výtěžnost prokázaly vysoký stupeň rozptylu v těchto experimentech (relativní směrodatná odchylka > 10 %).

31. Je třeba uvést podrobnosti o analytické metodě. To zahrnuje metodu extrakce, faktory zakoncentrování a ředění, parametry přístrojů, kalibrační postup, kalibrační rozpětí, analytický výtěžek zkoušené chemické látky z vody, přidání náhradních standardů pro korekci na výtěžnost, hodnoty slepých vzorků, meze stanovitelnosti a meze kvantitativní stanovitelnosti.

Provedení zkoušky

Optimální poměry objemu oktan-1-olu/vody

32. Při volbě objemu vody a oktan-1-olu je třeba vzít v potaz mez stanovitelnosti (LOQ) v oktan-1-olu a vodě, koncentrační faktory použité u vodných vzorků, objemy vzorků odebíraných z oktan-1-olu a vody a očekávané koncentrace. Z experimentálních důvodů by se měl zvolit takový objem oktan-1-olu v systému pomalého míchání, aby byla vrstva oktan-1-olu dostatečně silná (> 0,5 cm), a umožnila tak odběr vzorků z oktan-1-olové fáze bez jejího porušení.

33. Obvyklé poměry mezi fázemi používané pro stanovení sloučenin s hodnotou log P_{ow} = 4,5 a vyšší činí 20–50 ml oktan-1-olu a 950–980 ml vody v nádobě o objemu jeden litr.

▼M4

Zkušební podmínky

34. Reakční nádoba se v průběhu zkoušky termostatuje, aby nedocházelo ke kolísání teploty o více než 1 °C. Stanovení by se mělo provádět při teplotě 25 °C.

35. Experimentální systém by měl být chráněn před denním světlem buď prováděním experimentu v tmavé komoře, nebo zakrytím reakční nádoby hliníkovou fólií.

36. Experiment by se měl provádět v (co možná nejvíce) bezprašném prostředí.

37. Systém oktan-1-ol–voda se míchá až do dosažení rovnovážného stavu. V zkušebním experimentu se stanoví doba, za jakou dojde k ustavení rovnováhy, provedením experimentu s pomalým mícháním a odebíráním vzorků vody a oktan-1-olu v pravidelných intervalech. Časy odběru jednotlivých vzorků by měly být navzájem odděleny intervalem alespoň pěti hodin.

38. Každé stanovení P_{ow} se musí provést pomocí nejméně tří nezávislých experimentů s pomalým mícháním.

Stanovení doby ustavení rovnováhy

39. Předpokládá se, že rovnovážného stavu je dosaženo, když regrese podílu koncentrací v oktan-1-olu/vodě v závislosti na čase v časovém rozmezí čtyř časových bodů vede ke směrnici, která se při hladině p = 0,05 výrazně neliší od nuly. Minimální doba nutná k ustavení rovnováhy, než lze zahájit odběr vzorků, je jeden den. Dle empirického pravidla lze u látek s odhadovanou hodnotou log P_{ow} menší než pět zahájit odběr vzorků během druhého a třetího dne. U hydrofobnějších látek může být nutné tuto dobu ekvilibrace prodloužit. Sloučenina s hodnotou log P_{ow} 8,23 (dekachlorobifenyl) stačilo k dosažení rovnováhy 144 hodin. Rovnováha se stanoví pomocí opakovaného odběru vzorků z jedné nádoby.

Zahájení experimentu

40. Na začátku experimentu se reakční nádoby naplní oktan-1-olem nasyceným vodou. Je třeba vyčkat dostatečnou dobu, aby se dosáhlo teploty termostatování.

41. Požadované množství zkoušené chemické látky (rozpuštěné v potřebném objemu oktan-1-olu nasyceného vodou) se opatrně přidá do reakční nádoby. Tento krok je kritický, neboť je nutno zabránit turbulentnímu promíchání obou fází. Proto se oktan-1-olová fáze se pipetuje pomalu proti stěně experimentální nádoby v blízkosti povrchu vody. oktan-1-olová fáze poté steče po skleněné stěně a vytvoří vrstvičku nad vodnou fází. Vždy by se mělo zabránit přímé dekantaci oktan-1-olu do nádoby, kapičky oktan-1-olu by neměly padat přímo do vody.

42. Po zahájení míchání by se měla pomalu zvyšovat rychlost míchání. Nelze-li míchací motory vhodně nastavit, mělo by se zvážit použití transformátoru. Rychlost míchání by se měla nastavit tak, aby se v místě fázového rozhraní vody a oktan-1-olu vytvořil vír o hloubce 0,5 až maximálně 2,5 cm. Rychlost míchání by se měla snížit, jestliže hloubka víru překročí 2,5 cm. Jinak se mohou z kapiček oktan-1-olu ve vodě vytvořit mikrokapičky, což vede k přecenění odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě. Tato maximální rychlost míchání 2,5 cm se doporučuje na základě výsledků validační studie mezilaboratorních testů (5). Jedná se o kompromis mezi rychlým dosažením rovnováhy a omezením tvorby mikrokapiček oktan-1-olu.

▼M4

Odběr a zpracování vzorků

43. Před odběrem vzorků by se měla míchačka vypnout a vyčkat, až ustane pohyb kapaliny. Po dokončení odběru vzorků se míchačka opět pomalu spustí způsobem popsaným výše a rychlost míchání se postupně zvýší.

44. Vzorky vodné fáze se odebírají z uzavíracího kohoutu ve spodní části reakční nádoby. Vždy je třeba vylít mrtvý objem vody, který zůstává v kohoutcích (přibližně 5 ml u nádoby vyobrazené v dodatku 2). Voda v kohoutcích se nemíchá, a proto není v rovnováze s hlavním objemem vody v nádobě. Zaznamená se objem vodných vzorků. Při stanovování látkové bilance je nutné vzít v úvahu množství zkoušené chemické látky obsažené ve vylité vodě. Ztráty odparem by se měly minimalizovat tím, že se voda nechá pomalu vtékat do dělící nálevky tak, aby se při tom nenarušila vrstva voda/oktan-1-ol.

45. Oktan-1-olové vzorky se získají odebráním malého množství (asi 100 μl) oktan-1-olové vrstvy pomocí 100mikrolitrové sklo-kovové stříkačky. Je třeba dát pozor, aby se nenarušila hranice mezi fázemi. Objem odebraného vzorku se zaznamená. Malé množství stačí, neboť oktan-1-klový vzorek se bude ředit.

46. Vzorky není vhodné zbytečně převádět. Proto by se měl objem vzorku stanovit gravimetricky. V případě vodných vzorků toho lze dosáhnout soustředěním vodného vzorku do dělící nálevky, která již obsahuje požadovaný objem rozpouštědla.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

47. V souladu se stávající zkušební metodou se P_{ow} stanoví provedením tří experimentů používajících pomalé míchání (tři experimentální jednotky) se studovanou sloučeninou za identických podmínek. Regrese použitá k prokázání dosažení rovnovážného stavu by měla vycházet z výsledků alespoň čtyř stanovení C_o/C_w po sobě jdoucích časových bodech. To umožňuje vypočítat rozptyl jako měřítko neurčitosti průměrné hodnoty získané u každé experimentální jednotky.

48. P_{ow} lze charakterizovat rozptylem údajů získaných pro každou experimentální jednotku. Tato informace se použije k výpočtu P_{ow} jako váženého průměru výsledků jednotlivých experimentálních jednotek. Provede se to tak, že se převrácená hodnota rozptylu výsledků experimentálních jednotek použije jako váha. Údaje s velkou variabilitou (vyjádřenou jako rozptyl), a tedy s nižší spolehlivostí, pak budou mít menší vliv na výsledek než údaje s nízkou variabilitou.

49. Analogicky se vypočítá vážená směrodatná odchylka. Ta charakterizuje opakovatelnost měření P_{ow}. Nízká hodnota vážené směrodatné odchylky naznačuje, že stanovení P_{ow} bylo v rámci jedné laboratoře vysoce opakovatelné. Formální statistické zpracování údajů je uvedeno níže.

▼M4

Zpracování výsledků

Prokázání dosažení rovnovážného stavu

50. Pro každý čas odběru vzorku se vypočítá logaritmus podílu koncentrace zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě (log (C_o/C_w)). Dosažení chemické rovnováhy se prokáže z grafu závislosti tohoto podílu na čase. Plato v grafu, které prochází alespoň čtyřmi po sobě jdoucími časovými body, dokazuje, že bylo dosaženo rovnovážného stavu a že sloučenina je skutečně rozpuštěna v oktan-1-olu. Pokud tomu tak není, je třeba ve zkoušce pokračovat, dokud se směrnice čtyř po sobě jdoucích bodů nebude jen málo odlišovat od nuly při hladině p = 0,05, což dokazuje, že hodnota log C_o/C_w nezávisí na čase.

Výpočet log P_{ow}

51. Hodnota log P_{ow} experimentální jednotky se vypočítá jako vážený průměr log C_o/C_w pro tu část křivky závislosti log C_o/C_w na čase, pro niž bylo prokázáno dosažení rovnovážného stavu. Vážený průměr se vypočítá tak, že se jako váha údajů použije převrácená hodnota rozptylu, takže vliv údajů na konečný výsledek je nepřímo úměrný neurčitosti údajů.

Průměrná hodnota log P_{ow}

52. Průměrná hodnota log P_{ow} různých experimentálních jednotek se vypočítá jako průměr výsledků jednotlivých experimentálních jednotek vážený jejich příslušnými rozptyly.

Výpočet se provádí takto:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kde:

$\log P_{ow,i}$ = hodnota log P_{ow} jednotlivé experimentální jednotky i;

$\log P_{ow,Av}$ = hodnota váženého průměru jednotlivých stanovení log P_{ow};

w_i = statistická váha přidělená hodnotě log P_{ow} experimentální jednotky i.

Jako w_i se použije reciproká hodnota rozptylu log $P_{ow,i}$ $w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$

53. Chyba průměru log P_{ow} se odhadne jako opakovatelnost log C_o/C_w stanoveného během rovnovážné fáze v jednotlivých experimentálních jednotkách. Vyjadřuje se jako vážená směrodatná odchylka log $P_{ow,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), která je zase měřítkem chyby spojené s log $P_{ow,Av}$. Váženou směrodatnou odchylku σσlze vypočítat z váženého rozptylu ($var_{\log P_{ow,Av}}$) ($var_{\log Pow,Av}$) takto:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Písmeno „n“ označuje počet experimentálních jednotek.

▼M4

Protokol o zkoušce

54. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (určující polohu značky, pokud se používá radioizotopově značkovaná látka) a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (viz odstavec 17),

— čistota (nečistoty) zkoušené chemické látky,

— čistota značky u značených chemických látek a molární aktivitu (je-li to vhodné),

— předběžný odhad hodnoty log P_{ow} a rovněž metodu použitou k jejímu odvození.

Zkušební podmínky:

— data provedení studií,

— teplota během experimentu,

— objemy oktan-1-olu a vody na začátku zkoušky,

— objemy odebraných vzorků oktan-1-olu a vody,

— zbylé objemy oktan-1-olu a vody ve zkušebních nádobách,

— popis použitého laboratorního nádobí a podmínek míchání (rozměry míchací tyčinky a zkušební nádoby, výška víru v mm a rychlost míchání, je-li k dispozici),

— analytické metody použité k stanovení zkoušené chemické látky a mez kvantitativní stanovitelnosti dané metody,

— časy odběru vzorků,

— pH vodné fáze a použité pufry, jestliže je pH upraveno s ohledem na ionizovatelné molekuly,

— počet opakování.

Výsledky:

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— stanovené koncentrace zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě v závislosti na čase,

— vyjádření látkové bilance,

— teplota a směrodatná odchylka teplotního rozmezí během experimentu,

— regrese podílu koncentrací v závislosti na čase,

— průměrná hodnota log $P_{ow,Av}$ a její směrodatná odchylka,

— diskuse a interpretace výsledků,

▼M4

— příklady naměřených údajů z reprezentativní analýzy (všechny naměřené údaje musí být uloženy v souladu se zásadami správné laboratorní praxe), včetně výtěžků náhrad a počtu ředění použitých při kalibraci (spolu s kritérii pro korelační koeficient kalibrační křivky) a výsledky zajištění kvality/kontroly kvality (QA/QC),

— případně validační zpráva o postupu zkoušky (uvede se v literatuře).

LITERATURA:

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

2) Kapitola A.8 této přílohy, Rozdělovací koeficient.

3) Kapitola A.8 této přílohy, Rozdělovací koeficient.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Kapitola A.6 této přílohy, Rozpustnost ve vodě.

11) Kapitola C.7 této přílohy, Rozklad – Abiotický rozklad – hydrolýza jako funkce pH.

12) Kapitola C.4 – část II–VII (metoda A až F) této přílohy, Stanovení „snadné" biologické rozložitelnosti.

13) Kapitola A.4 této přílohy, Tlak par.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Dodatek 1

Tabulka pro výpočet minimálních objemů vody nutných k detekci zkoušených látek o různých hodnotách log P_{ow} ve vodné fázi

Předpoklady:

— Maximální objem jednotlivých podílů = 10 % celkového objemu; 5 podílů = 50 % celkového objemu.

— Koncentrace zkoušen»ch látek = $0,7 \times$ rozpustnost vkaždé zfází. V případě nižších koncentrací budou potřeba větší objemy.

— Objem použitý ke stanovení meze stanovitelnosti (LOD) = 100 ml.

— log P_{ow} oproti log S_w a log P_{ow} oproti SR (S_o/S_w) vhodně vyjadřují vztahy zkoušených chemických látek.

Odhad S_w

log P_{ow}	rovnice	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

Odhad S_o

log P_{ow}	rovnice	S_o (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Celková hmotnost m zkoušené chemické látky (mg)	m_o/m_w	m_w (mg)	C_w (mg/l)	m_o (mg)	C_o (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Výpočet objemů

Minimální požadovaný objem vodné fáze při jednotlivých koncentracích LOD

log P_{ow}	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Objem použitý pro LOD (l)	0,1					

Legenda k výpočtům:

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 1 litr.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 2 litry.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 5 litrů.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 10 litrů.

Přesahuje 10 % objemu, a to i u ekvilibrační nádoby o objemu 10 litrů.

▼M4

Přehled požadovaných objemů v závislosti na rozpustnosti ve vodě a log P_{ow}

Minimální požadovaný objem fáze H_2O při každé koncentraci LOD (ml)

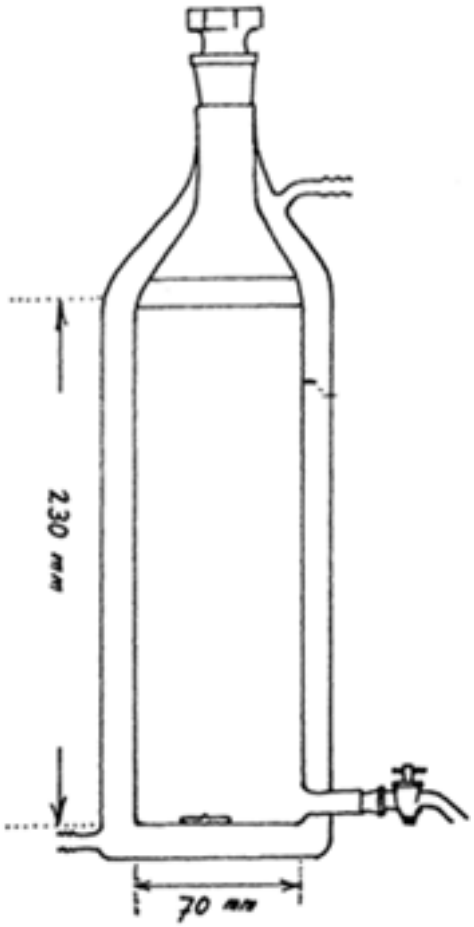
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼M4

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Objem použitý pro LOD (l)		0,1					

Dodatek 2

Příklad nádoby se skleněným pláštěm pro experiment používající metodu pomalého míchání k stanovení P_{ow}



▼B

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY A JINÝCH ÚČINKŮ NA ZDRAVÍ

OBSAH

OBECNÝ ÚVOD

B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY

B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

B.2 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA

B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE

B.7 STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY U HLODAVCŮ – 28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE

B.8 SUBAKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA: 28DENNÍ STUDIE

B.9 DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

B.10 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE U SAVCŮ *IN VITRO*

B.11 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ *IN VIVO*

B.12 MUTAGENITA – TEST SAVČÍCH ERYTROCYTÁRNÍCH MIKROJADER *IN VIVO*

B.13/14 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI

B.15 ZKOUŠENÍ MUTAGENITY A SCREENING KARCINOGENITY – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16 ZKOUŠKA NA MITOTICKOU REKOMBINACI U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO*

B.18 ZKOUŠKA NA POŠKOZENÍ A REPARACI DNA – NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA – V SAVČÍCH BUŇKÁCH *IN VITRO*

B.19 ZKOUŠKA NA VÝMĚNU SESTERSKÝCH CHROMATID *IN VITRO*

B.20 ZKOUŠKA NA RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21	ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO*
B.22	DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH
B.23	ZKOUŠKA NA CHROMOSOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ
B.24	SPOT TEST NA MYŠÍCH
B.25	ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ
B.26	ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)
B.27	ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
B.28	STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)
B.29	SUBCHRONICKÁ INHALAČNÍ TOXICITA: 90DENNÍ STUDIE
B.30	STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY
B.31	STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY
B.32	STUDIE KARCINOGENITY
B.33	KOMBINOVANÉ STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY
B.34	JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI
B.35	DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY
B.36	TOXIKOKINETIKA
B.37	POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI
B.38	POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE
B.39	ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*
B.40	LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
B.40.a	LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU LIDSKÉ KŮŽE

▼**B**

B.41	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42	SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN
B.43	ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH
B.44	ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*
B.45	ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO*
B.46	DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS
B.47	ZKUŠEBNÍ METODA PRO ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY U SKOTU PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI
B.48	ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI
B.49	ZKOUŠKA *IN VITRO* NA PŘÍTOMNOST MIKROJADER V BUŇKÁCH SAVCŮ
B.50	SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: DA
B.51	SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52.	AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

▼**M5**

B.53.	STUDIE VÝVOJOVÉ NEUROTOXICITY
B.54.	UTEROTROFNÍ BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ESTROGENNÍCH VLASTNOSTÍ
B.55.	HERSHBERGEROVA BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA POTKANECH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ANDROGENNÍCH/ANTIANDROGENNÍCH VLASTNOSTÍ
B.56.	ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ STUDIE TOXICITY PRO REPRODUKCI
B.57.	ZKOUŠKA STEROIDOGENEZE H295R
B.58.	ZKOUŠKY GENOVÝCH MUTACÍ U SOMATICKÝCH A ZÁRODEČNÝCH BUNĚK TRANSGENNÍCH HLODAVCŮ

▼B

OBECNÝ ÚVOD

A. CHARAKTERIZACE ZKOUŠENÉ LÁTKY

Složení zkoušené látky, včetně hlavních nečistot, a její relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně stálosti, by měly být známy před zahájením jakékoli studie toxicity.

Fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené látky poskytují důležité informace pro výběr způsobu podávání, pro návrh každé jednotlivé studie a pro manipulaci se zkoušenou látkou a její uchovávání.

Zahájení studie by měl předcházet vývoj analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení zkoušené látky (pokud možno včetně hlavních nečistot) v dávkovacím médiu a v biologickém materiálu.

Veškeré informace týkající se identifikace, fyzikálně-chemických vlastností, čistoty a chování zkoušené látky by měly být obsaženy v protokolu o zkoušce.

B. PÉČE O ZVÍŘATA

Při zkoušení toxicity jsou důležité přísná kontrola podmínek prostředí a správná péče o zvířata.

i) *Podmínky chovu*

Podmínky chovu v prostorech nebo klecích pro pokusná zvířata by měly vyhovovat testovacím druhům. Pro potkany, myši a morčata jsou vhodnými podmínkami teplota místnosti 22 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %; pro králíky se doporučuje teplota 20 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %.

Některé experimentální techniky jsou zvláště citlivé na vliv teploty a v takových případech jsou v popisu zkušební metody uvedeny podrobnosti o vhodných podmínkách. Při všech sledováních toxických účinků by měly být zaznamenávány údaje o teplotě a vlhkosti a měly by být zahrnuty do závěrečné zprávy o studii.

Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Podrobnosti o světelném režimu by měly zaznamenány a uvedeny v konečné zprávě studie.

Není-li v metodě uvedeno jinak, měla by být zvířata chována jednotlivě nebo umístěna v klecích po malých skupinách stejného pohlaví; jsou-li zvířata v klecích po skupinách, nemělo by být chováno v jedné kleci více než pět zvířat.

Ve zprávách o experimentech na zvířatech je důležité uvést typ použité klece a počet zvířat chovaných v každé kleci jak během expozice chemické látce, tak během kterékoli další doby pozorování.

▼B

ii) *Podmínky krmení*

Strava by měla splňovat veškeré požadavky výživy pro příslušný testovací druh. Pokud jsou zkoušené látky podávány v potravě, může být nutriční hodnota snížena interakcí látky s některou složkou potravy. Možnost takové reakce by měla být zohledněna při interpretaci výsledků zkoušky. Může být použita konvenční laboratorní strava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Výběr potravy se může řídit potřebou zajistit vhodné přimíchání zkoušené látky, pokud je podávána touto metodou.

Příměsi v potravě, jejichž vliv na toxicitu je znám, nesmí být přítomny v koncentracích, ve kterých by se vliv projevil.

C. **ALTERNATIVNÍ ZKOUŠKY**

Vědeckým cílem Evropské unie je vývoj a validace alternativních metod, které mohou poskytnout stejnou úroveň informací jako současné zkoušky na zvířatech, při nichž se však použije méně zvířat, způsobí méně utrpení nebo se v nich použití zvířat zcela vypouští.

Hned po svém uvedení do praxe musí být tyto metody použity, kdykoli je to možné, pro charakterizaci nebezpečnosti a následnou klasifikaci a označování látek z hlediska jejich nebezpečnosti.

D. **HODNOCENÍ A INTERPRETACE**

Při hodnocení a interpretaci zkoušek musí být vzaty v úvahu určité meze, nakolik lze výsledky studií na zvířatech a *in vitro* extrapolovat na člověka, a proto lze pro potvrzení výsledků zkoušení použít poznatky o nepříznivých účincích na člověka, pokud jsou k dispozici.

E. **LITERATURA**

Tyto metody jsou většinou vyvinuty v rámci programu OECD pro zkušební pokyny a měly by být prováděny v souladu s principy správné laboratorní praxe, aby bylo zajištěno co nejširší „vzájemné uznávání údajů“.

Další podobnější informace lze získat v pokynech OECD a v příslušné literatuře publikované jinde.

▼B

B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 420 (2001).

1.1 ÚVOD

Tradiční metody hodnocení akutní toxicity používají jako koncový bod uhynutí zvířat. V roce 1984 navrhla Britská toxikologická společnost nový přístup k testování akutní toxicity založený na podávání řady fixních dávek (1). Tento přístup jako koncový bod nepoužíval uhynutí zvířat, nýbrž se opíral o pozorování jasných příznaků toxicity u jedné z řady fixních dávek. Po provedení britských (2) a mezinárodních (3) validačních studií *in vivo* byl tento postup v roce 1992 přijat jako zkušební metoda. Následně byly pomocí matematických modelů v řadě studií (4, 5, 6) vyhodnoceny statistické vlastnosti metody fixní dávky. Studie *in vivo* a modelové studie společně prokázaly, že metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat, působí menší utrpení než tradiční metody a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity.

Poučení týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.a.

Podstatou metody je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii, dávky, u nichž se očekává, že budou letální, by neměly být podávány. Také není nutné podávat dávky, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (8).

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařazení a klasifikaci látky podle globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (9).

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, výsledky jiných zkoušek toxicity dané látky, *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

▼B

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhyne později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

Zjevná toxicita: obecný pojem popisující zřetelné příznaky toxicity, které se projeví po podání zkoušené látky (příklady viz (3)), kdy při podání další vyšší fixní dávky lze u většiny pokusných zvířat očekávat značné bolesti a přetrvávající známky značného utrpení, stavu agónie (kritéria uvádí dokument Humane Endpoints Guidance (8)) nebo pravděpodobné uhynutí.

GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu u hlodavců mohou zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

LD_{50} (střední letální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známá a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

▼B

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Skupinám zvířat stejného pohlaví se postupně podá fixní dávka 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výjimečně lze uvažovat o další fixní dávce 5 000 mg/kg, viz část 1.6.2). Výchozí úroveň dávky se zvolí na základě orientační studie jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá některé příznaky toxicity, aniž způsobí závažné toxické účinky nebo úhyn. Klinické příznaky a stavy spojené s bolestí, utrpením a blížícím se úhynem jsou podrobně popsány v samostatném dokumentu OECD (8). Dalším skupinám zvířat mohou být podány vyšší nebo nižší fixní dávky podle přítomnosti nebo nepřítomnosti příznaků toxicity nebo uhynutí. Podle tohoto postupu se pokračuje, dokud nebude zjištěna dávka vyvolávající zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou ani při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (7). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD_{50} ukazuje, že mezi pohlavími je obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, ale v případech, v nichž jsou rozdíly pozorovány, jsou samice obecně nepatrně citlivější (10). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ± 20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí, a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem podávání látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

▼B

1.4.4 **Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na dalších 3–4 hodin u potkanů nebo 1–2 hodiny u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 **Orientační studie**

Cílem orientační studie je umožnit výběr vhodné výchozí dávky pro hlavní studii. Zkoušená látka se podává jednotlivým zvířatům postupně podle vývojového diagramu v příloze 1. Orientační studie je ukončena, jakmile lze stanovit výchozí dávku pro hlavní studii (nebo pokud je při nejnižší fixní dávce pozorován úhyn).

Výchozí dávka orientační studie se zvolí z fixních dávek ve výši 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu, přičemž toto očekávání je pokud možno založeno na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a strukturně příbuzných látek. Pokud takové informace neexistují, výchozí dávka činí 300 mg/kg.

Mezi podáním dávky každému zvířeti se ponechá doba minimálně 24 hodin. Všechna zvířata se pozorují minimálně 14 dnů.

▼B

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 3). S ohledem na dobré zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takového pokusu mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

V případech, kdy zvíře, u něhož je látka zkoušena v nejnižší fixní úrovni dávky (5 mg/kg), v orientační studii uhyne, obvykle se studie ukončí a látka přiřadí do kategorie 1 GHS (jak je uvedeno v příloze 1). Pokud je však vyžadováno další potvrzení klasifikace, může být proveden tento volitelný doplňkový postup: druhému zvířeti se podá dávka 5 mg/kg. Pokud toto druhé zvíře uhyne, bude kategorie 1 GHS potvrzena a studie okamžitě ukončena. Pokud druhé zvíře přežije, dávka 5 mg/kg se podá maximálně třem dalším zvířatům. Jelikož riziko úhynu bude vysoké, měla by být látka zvířatům podávána postupně, aby bylo zajištěno dobré zacházení se zvířaty. Časový interval mezi dávkami podanými jednotlivým zvířatům by měl být dostatečný na to, aby bylo možné stanovit, zda zvíře, jemuž byla látka podána dříve, pravděpodobně přežije. Pokud dojde k úhynu druhého zvířete, posloupnost podávání se okamžitě ukončí a látka nebude podána žádnému dalšímu zvířeti. Vzhledem k tomu, že výskyt druhého úhynu (bez ohledu na počet zvířat, na nichž byla látka v době ukončení zkoušena) spadá do výsledku A (2 anebo více úhynů), postupuje se podle pravidla klasifikace v příloze 2 s fixní dávkou 5 mg/kg (kategorie 1, pokud se vyskytnou dva a více úhynů nebo kategorie 2, pokud se nevyskytne více než 1 úhyn). Navíc je v příloze 4 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

1.5.3 **Hlavní studie**

1.5.3.1 *Počet zvířat a úrovně dávek*

Kroky, podle kterých se má postupovat po provedení zkoušek s výchozí úrovní dávky, jsou uvedeny ve vývojovém diagramu v příloze 2. Bude nutné zvolit jeden ze tří postupů: buď zkoušení ukončit a stanovit odpovídající klasifikační třídu nebezpečnosti, nebo provést zkoušky s vyšší fixní dávkou, nebo zkoušky s nižší fixní dávkou. S ohledem na ochranu zvířat se v hlavní studii znovu nepoužije úroveň dávky, která v orientační studii vedla k uhynutí (viz dodatek 2). Zkušenosti ukázaly, že nejpravděpodobnějším výsledkem u výchozí úrovně dávky bude, že látku lze klasifikovat bez nutnosti dalších zkoušek.

Obvykle se pro každou zkoumanou úroveň dávky použije celkem pět zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito pěti zvířaty bude jedno zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky, a další čtyři zvířata (kromě výjimečných případů, kdy úroveň dávky použité v hlavní studii nebyla součástí orientační studie).

Časový interval mezi podáváním jednotlivé výše dávky závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice zvířat další dávce bude odložena, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila. Mezi jednotlivými dávkami se v případě potřeby doporučuje ponechat dobu 3 nebo 4 dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné reakce.

▼B

Při zvažování použití nejvyšší fixní dávky 5 000 mg/kg se postupuje podle metody popsané v příloze 3 (viz také 1.6.2).

1.5.3.2 *Limitní zkouška*

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Podle obvyklého postupu slouží jako limitní zkouška pro tyto pokyny výchozí dávka orientační studie 2 000 mg/kg (nebo výjimečně 5 000 mg/kg), po níž následuje podání této výše dávky dalším čtyřem zvířatům.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (11). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou jednotlivě, pro každé zvíře.

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a poté humánně utratí.

▼B

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin po prvním podání dávky, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. **ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),

— původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru výchozí dávky.

▼B

Výsledky:

— údaje o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků), ve formě tabulky,

— údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,

— hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,

— datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,

— časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85–92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279–291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469–482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313–324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315–323. Human Exptl. Toxicol.

6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

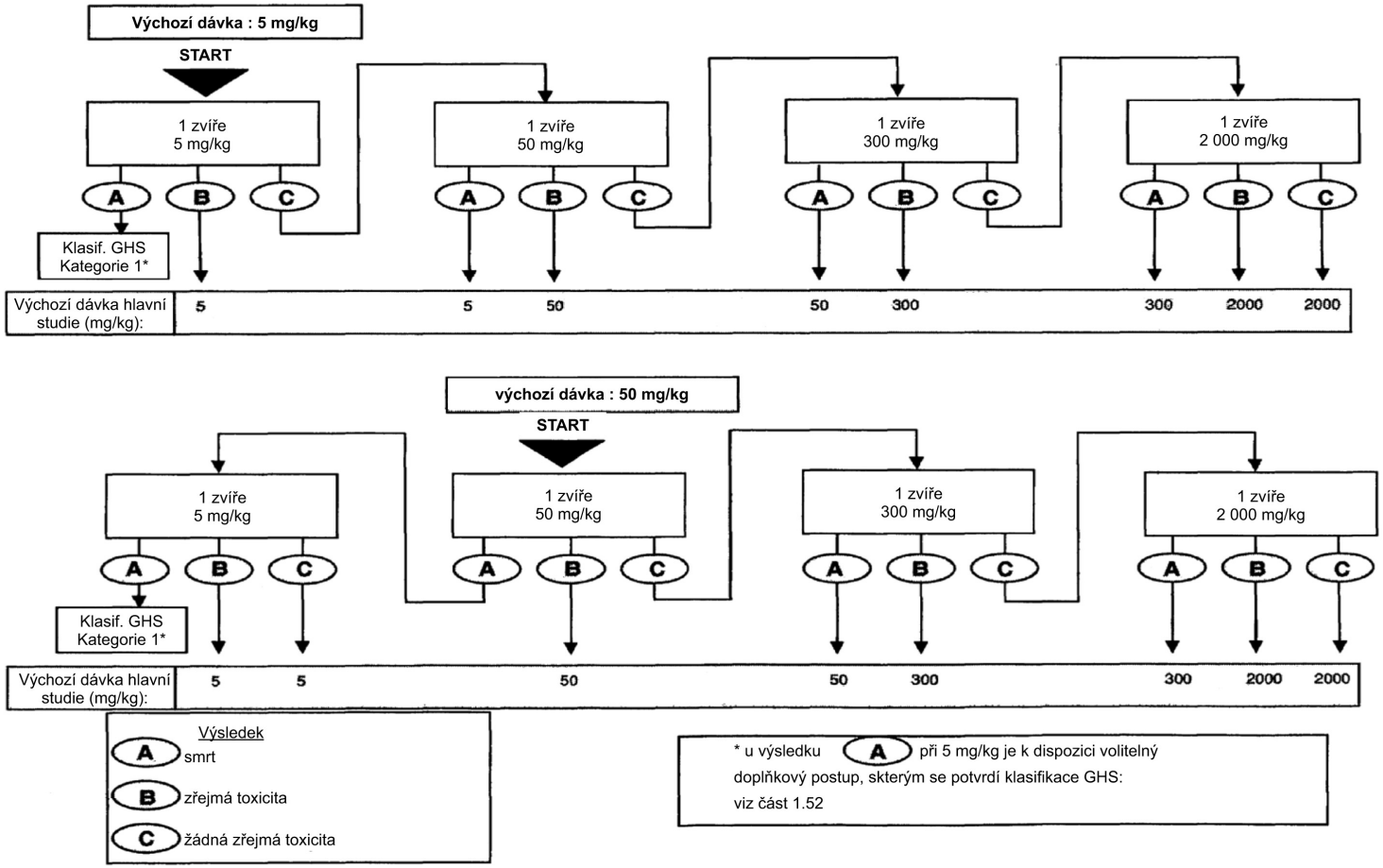
9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

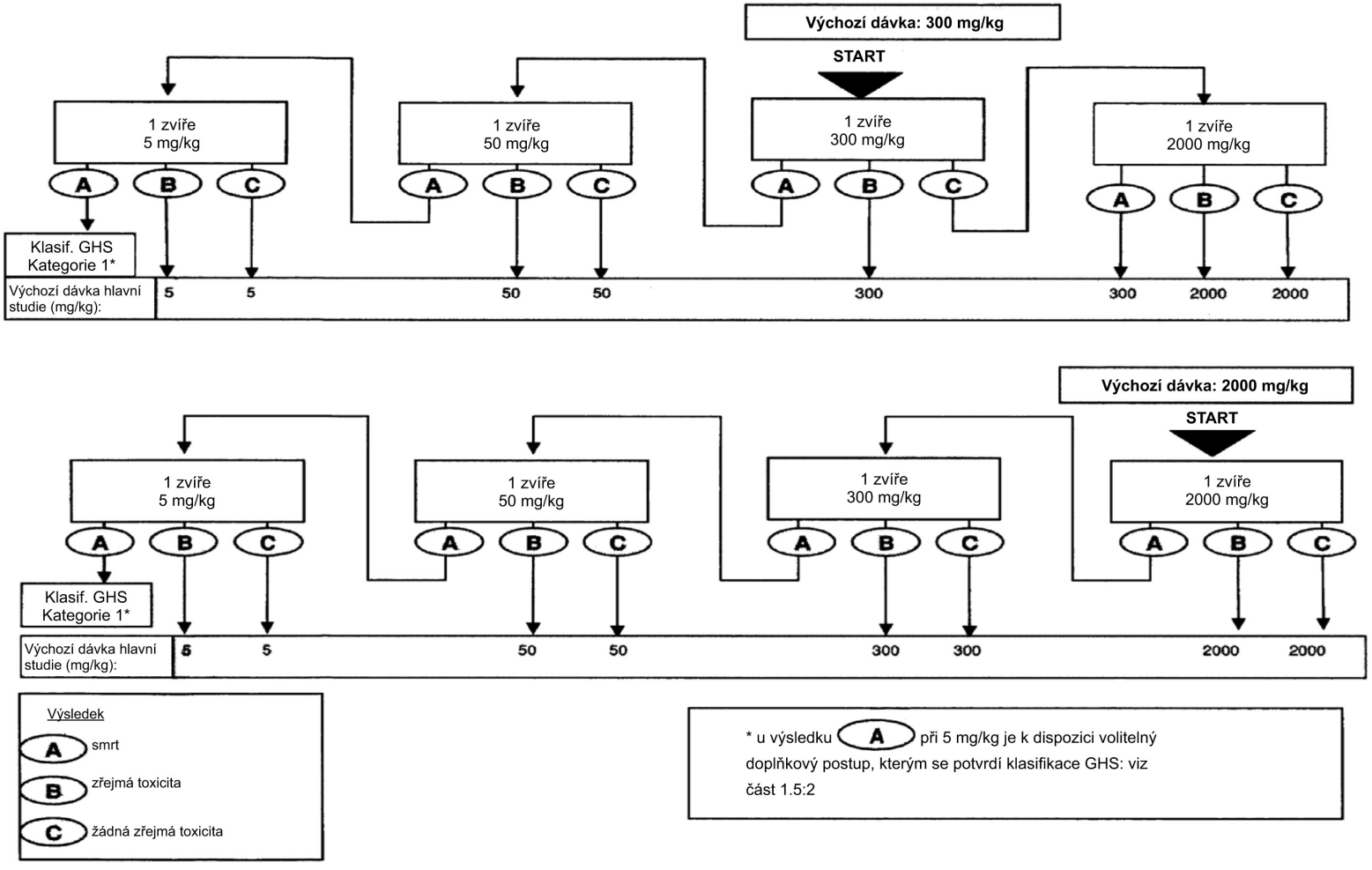
10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

DODATEK 1

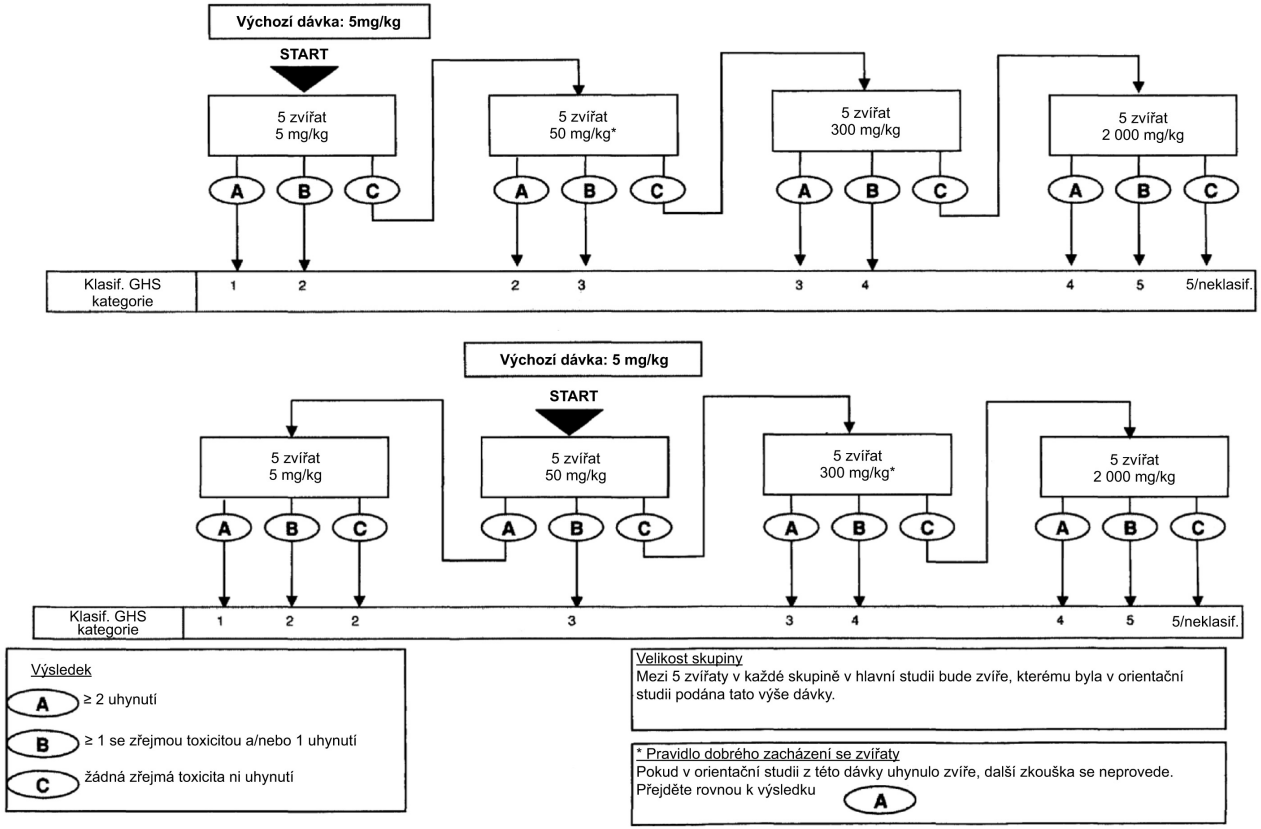
VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO ORIENTAČNÍ STUDII

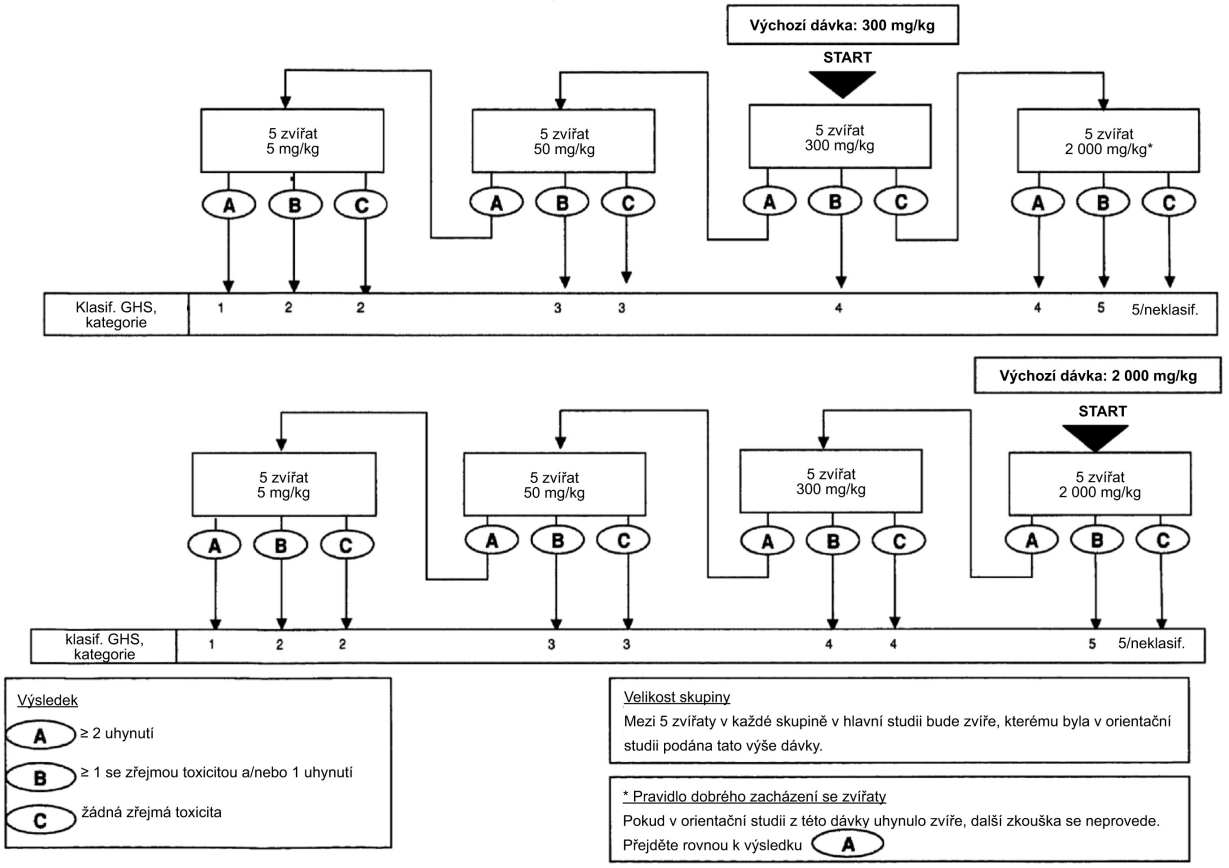



Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
1 zvíře 5 mg/kg
1 zvíře 50 mg/kg
1 zvíře 300 mg/kg
1 zvíře 2000 mg/kg
A
B
C
Klasif. GHS Kategorie 1*
Výchozí dávka hlavní studie (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Výchozí dávka: 2000 mg/kg
START
1 zvíře 5 mg/kg
1 zvíře 50 mg/kg
1 zvíře 300 mg/kg
1 zvíře 2000 mg/kg
Klasif. GHS Kategorie 1*
Výchozí dávka hlavní studie (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Výsledek
A smrt
B zřejmá toxicita
C žádná zřejmá toxicita
* u výsledku A při 5 mg/kg je k dispozici volitelný doplňkový postup, kterým se potvrdí klasifikace GHS: viz část 1.5:2

DODATEK 2

VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO HLAVNÍ STUDII




Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
5 zvířat
5 mg/kg
5 zvířat
50 mg/kg
5 zvířat
300 mg/kg
5 zvířat
2 000 mg/kg*
A
B
C
Klasif. GHS, kategorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasif.
Výchozí dávka: 2 000 mg/kg
START
5 zvířat
5 mg/kg
5 zvířat
50 mg/kg
5 zvířat
300 mg/kg
5 zvířat
2 000 mg/kg
klasif. GHS, kategorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasif.
Výsledek
A ≥ 2 uhynutí
B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí
C žádná zřejmá toxicita
Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato výše dávky.
* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty
Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede.
Přejděte rovnou k výsledku A

▼B

DODATEK 3

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD_{50} nebo LD_{50} ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušené látky lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (v GHS kategorie 5) v těchto případech:

a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze způsobů zkoušení uvedeného v příloze 2, a to v závislosti na výskytech uhynutí;

b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD_{50} se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo z toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;

c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a

— pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo

— pokud je během zkoušení orální cestou s dávkami nejvýše kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo

— v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování s dávkami nejvýše kategorie 4 s výjimkou průjmu, zježení srsti nebo rozcuchané srsti, nebo

— v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 MG/KG

Ve výjimečných případech, a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně fixní dávky 5 000 mg/kg. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení s dávkami 5 000 mg/kg nedoporučuje, mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky by měly přímý význam pro ochranu zvířat nebo lidského zdraví (9).

Orientační studie

Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 1, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se v orientační studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, výsledek A (úhyn) povede k nutnosti zkoušet na druhém zvířeti dávku 2 000 mg/kg. Výsledky B a C (zřejmá toxicita nebo žádná toxicita) umožní zvolit dávku 5 000 mg/kg za výchozí dávku hlavní studie. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledky B nebo C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg bude vyžadovat výchozí dávku hlavní studie 2 000 mg/kg a výsledky B a C budou vyžadovat výchozí dávku v hlavní studii 5 000 mg/kg.

▼B

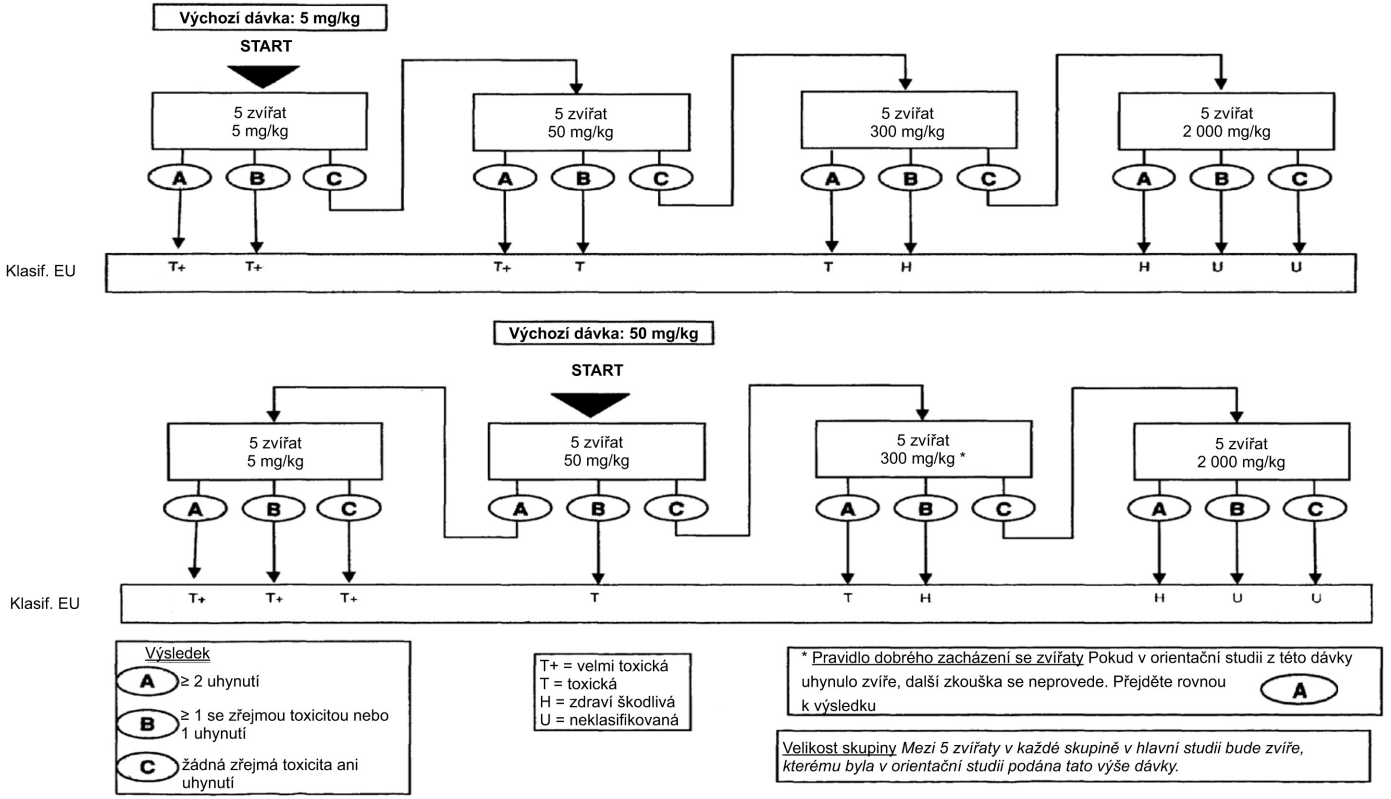
Hlavní studie

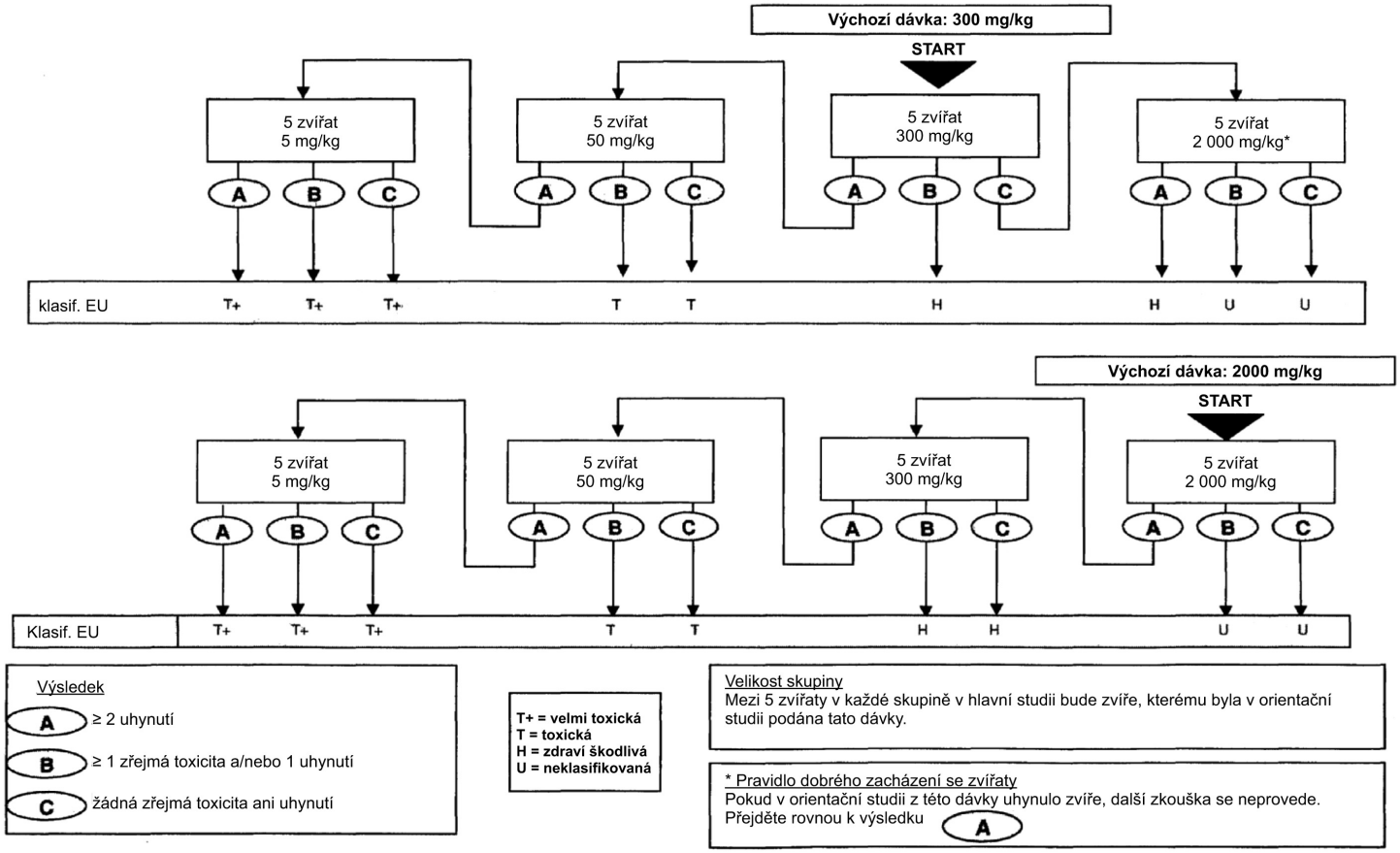
Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 2, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se tedy v hlavní studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, bude výsledek A ($\geq$ 2 úhyny) vyžadovat zkoušení dávky 2 000 mg/kg na druhé skupině. Výsledek B (zřejmá toxicita a/nebo $\leq$ 1 úhyn) nebo C (žádná toxicita) povedou k tomu, že látka nebude podle GHS klasifikována. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledek C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg povede k tomu, že se látka přiřadí do kategorie 5 GHS a na základě výsledku B nebo C látka nebude klasifikována.

DODATEK 4

ZKUŠEBNÍ METODA B.1.a

Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))




Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg*
A B C
klasif. EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Výchozí dávka: 2000 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg
Klasif. EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Výsledek
A ≥ 2 uhynutí
B ≥ 1 zřejmá toxicita a/nebo 1 uhynutí
C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí
T+ = velmi toxická
T = toxická
H = zdraví škodlivá
U = neklasifikovaná
Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato dávky.
* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty
Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede.
Přejděte rovnou k výsledku A

▼B

B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá metodě OECD TG 423 (2001).

1.1 ÚVOD

Metoda stanovení třídy akutní toxicity (1) stanovená v této zkoušce je metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví. V závislosti na úmrtnosti a/nebo stavu agónie zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené látky rozhodnout průměrně na základě 2 až 4 kroků. Tato metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity. Metoda stanovení třídy akutní toxicity je založena na biometrickém hodnocení (2)(3)(4)(5) s fixními dávkami, přiměřeně oddělenými tak, aby umožnila zařazení látky pro účely klasifikace a posouzení nebezpečnosti. Metoda přijatá v roce 1996 byla podrobena rozsáhlým národním (6) mezinárodním (7) validačním studií *in vivo* pro srovnání s hodnotami LD_{50} získanými z literatury.

Obecný návod týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.b.

Není nutné podávat zkoušené látky v dávkách, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (9).

Metoda využívá předem stanovených dávek a její výsledky umožňují látku zařadit a klasifikovat podle globálně harmonizovaného systému klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (10).

V zásadě tato metoda neslouží k vypočtení přesné hodnoty LD_{50}, ale umožňuje určit definované rozpětí expozice, při které se předpokládá letalita, neboť hlavním koncovým vyhodnocením této zkoušky zůstává uhynutí části zvířat. Metoda umožňuje stanovit hodnotu LD_{50}, pouze pokud alespoň dvě dávky vedou k mortalitě vyšší než 0 % a nižší než 100 %. Použití výběru předem stanovených dávek, bez ohledu na zkoušenou látku, u něhož se klasifikace explicitně váže k počtu zvířat pozorovaných v různých stavech, zvyšuje možnost konzistentního a opakovaného předávání zpráv mezi laboratořemi.

▼B

Zkušební laboratoř vezme před provedením studie v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledek jiných zkoušek toxicity dané látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru nejvhodnější výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: se vztahuje na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhyne později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

GHS: globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu mohou u hlodavců zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

LD_{50} (střední letální orální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známa a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Podstatou zkoušky je, že se pomocí metody po krocích, využívající minimálního počtu zvířat u každého kroku, získají informace o akutní toxicitě zkoušené látky, které umožní její klasifikaci. Látka se skupině pokusných zvířat podává orálně v jedné ze stanovených dávek. Látka se zkouší metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví (obvykle samice). Přítomnost nebo nepřítomnost mortality vyvolané látkou u zvířat, jimž byla látka podána v jednom kroku, rozhodne o dalším kroku, tj.:

— není třeba žádné další zkoušení,

— podá se stejná dávka dalším třem zvířatům,

— látka se podá dalším třem zvířatům v nejbližší vyšší nebo nejbližší nižší úrovni dávky.

Podrobnosti postupu zkoušení jsou uvedeny v příloze 1. Metoda umožní rozhodnout s ohledem na zařazení zkoušené látky do jedné z řady tříd toxicity definovaných fixními hraničními hodnotami LD_{50}.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (9). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD_{50} ukazuje, že ačkoliv je mezi pohlavími obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, jsou samice v případech, ve kterých jsou rozdíly pozorovány, obecně nepatrně citlivější (11). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ±20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

▼B

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí a chovají se v klecích minimálně pět dnů před podáním látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

1.4.4 **Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na další 3–4 hodiny u potkanů nebo 1–2 hodiny u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 **Počet zvířat a úrovně dávek**

V každém kroku se používají tři zvířata. Dávka, která bude použita jako výchozí, se zvolí z jedné ze čtyř fixních úrovní: 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Výchozí dávka by měla být taková, která nejpravděpodobněji vyvolá uhynutí některých zvířat, jimž bude podána. Postup, který je nutno u každé výchozí dávky dodržet, je popsán ve vývojových diagramech v příloze 1. V příloze 4 jsou uvedeny pokyny týkající se klasifikace v rámci systému EU do doby, než bude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

▼B

Pokud dostupné informace naznačují, že při nejvyšší úrovni výchozí dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti) je úmrtnost nepravděpodobná, je nutné provést limitní zkoušku. Pokud nejsou o látce, která má být zkoušena, k dispozici žádné informace, doporučuje se, z důvodů dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, použít výchozí dávku 300 mg/kg tělesné hmotnosti.

Časový interval mezi experimentálními skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Podání další dávky bude odloženo, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg tělesné hmotnosti (viz dodatek 2). S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

1.5.3 **Limitní zkouška**

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti lze provést na šesti zvířatech (tři zvířata na jeden krok). Výjimečně lze na třech zvířatech provést limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 2). Projeví-li se úmrtnost vyvolaná zkoušenou látkou, budou další zkoušky uskutečněny s nejbližší nižší úrovní dávky.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (12). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře jednotlivě.

▼B

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. **DATA**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. **ZPRÁVY**

3.1 **Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálněchemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

▼B

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),

— původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

— údaje ve formě tabulky o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),

— údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,

— hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,

— datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,

— časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610

4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134

6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel k A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

DODATEK 1

POSTUP, KTERÝ MÁ BÝT U KAŽDÉ Z VÝCHOZÍCH DÁVEK DODRŽEN

OBECNÉ POZNÁMKY

Systém zkoušení u každé výchozí dávky obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

— Dodatek 1A: výchozí dávka je 5 mg na kg tělesné hmotnosti.

— Dodatek 1B: výchozí dávka je 50 mg na kg tělesné hmotnosti.

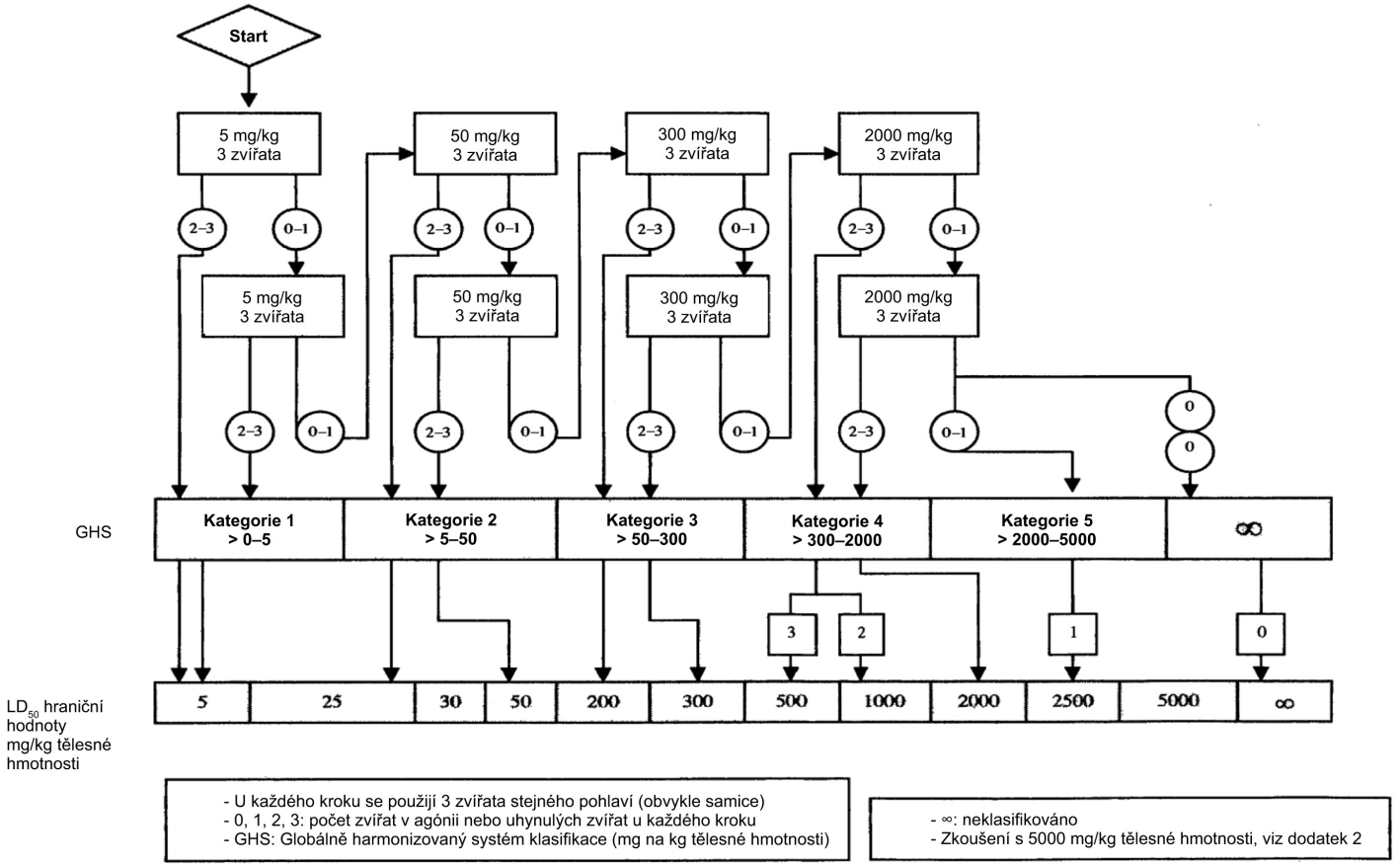
— Dodatek 1C: výchozí dávka je: 300 mg na kg tělesné hmotnosti.

— Dodatek 1D: výchozí dávka je: 2 000 mg na kg tělesné hmotnosti.

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

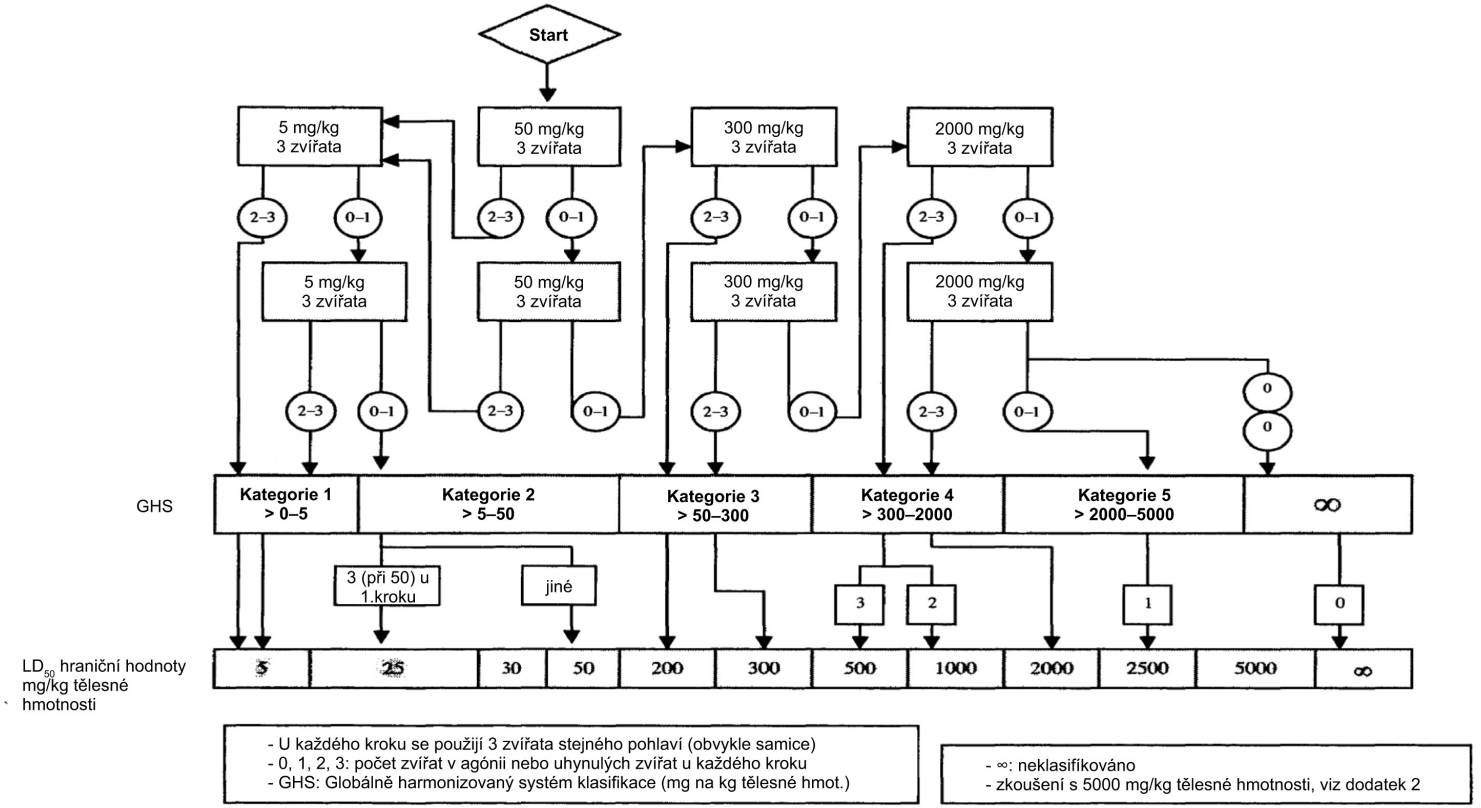
Dodatek 1A

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 5 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



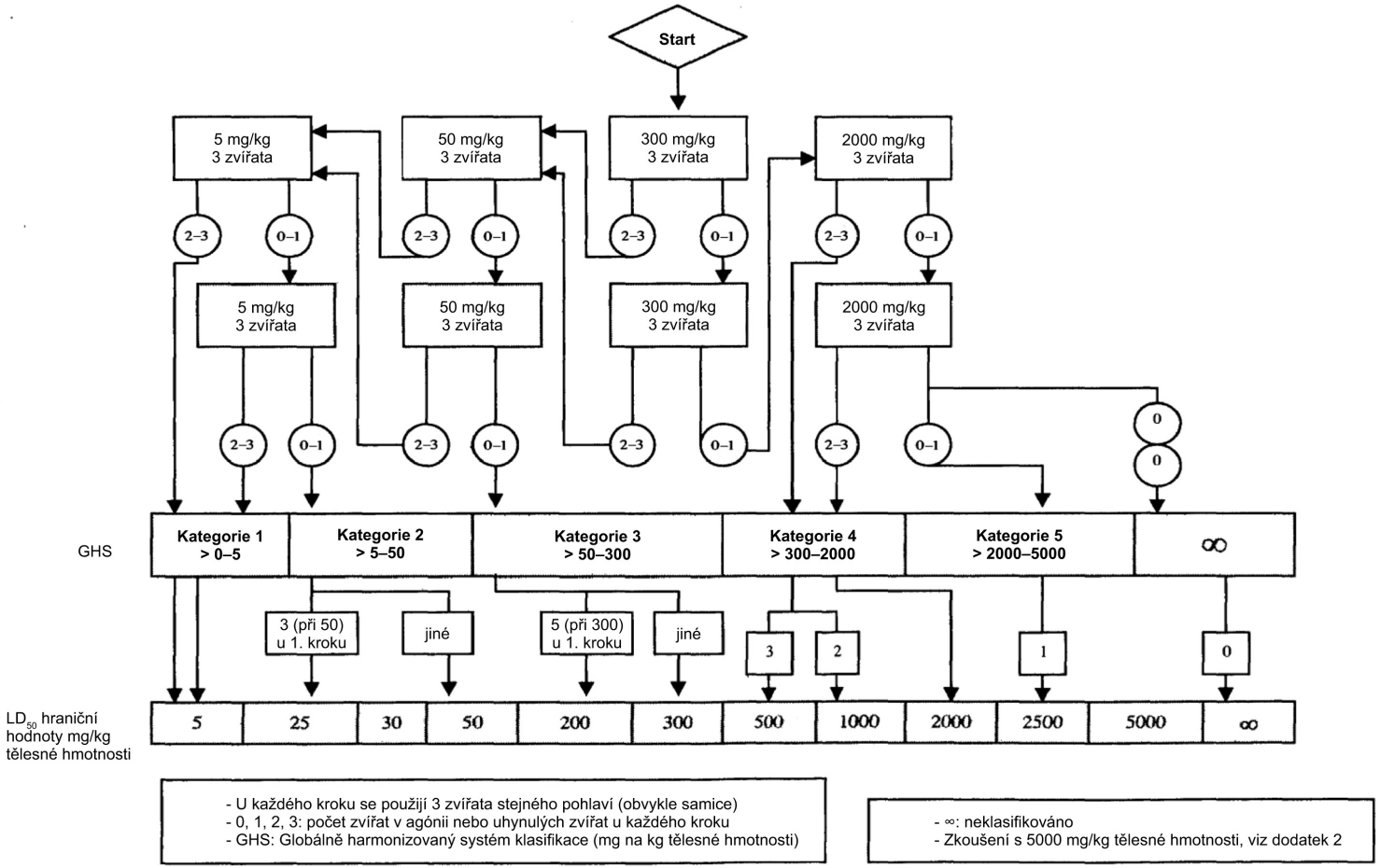
Dodatek 1B

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 50 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



Dodatek 1C

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 300 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI

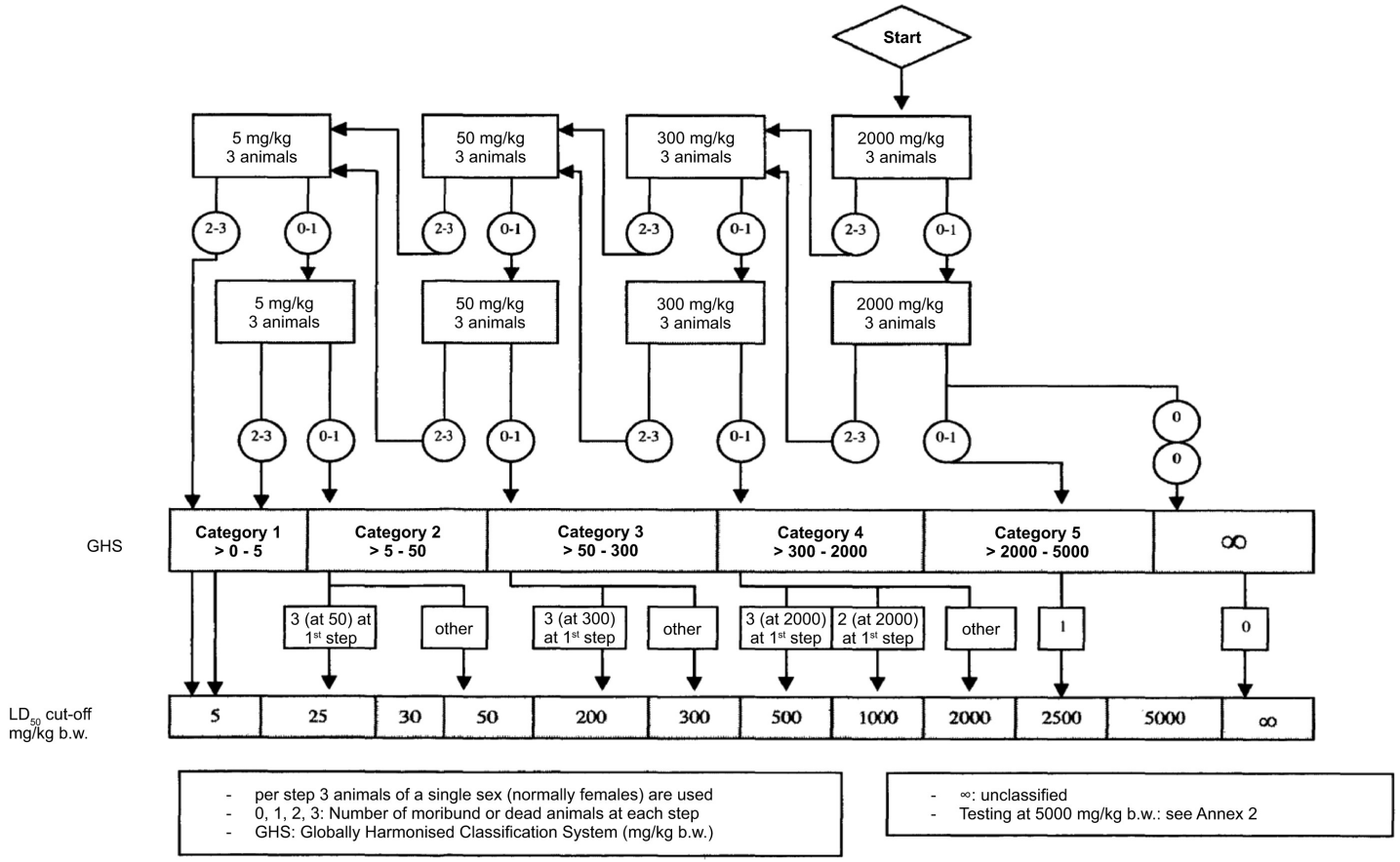


- U každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

- ∞: neklasifikováno
- Zkoušení s 5000 mg/kg tělesné hmotnosti, viz dodatek 2

Dodatek 1D

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 2 000 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



▼B

DODATEK 2

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity relativně nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD_{50} nebo LD_{50} ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušenou látku lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg v těchto případech (v GHS kategorie 5):

a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v příloze 1a–1d, v závislosti na výskytech uhynutí;

b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD_{50} se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;

c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a

   — pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující závažné toxické účinky na člověka, nebo

   — pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo

   — v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, zježení srsti nebo rozcuchané srsti, nebo

   — v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 MG/KG

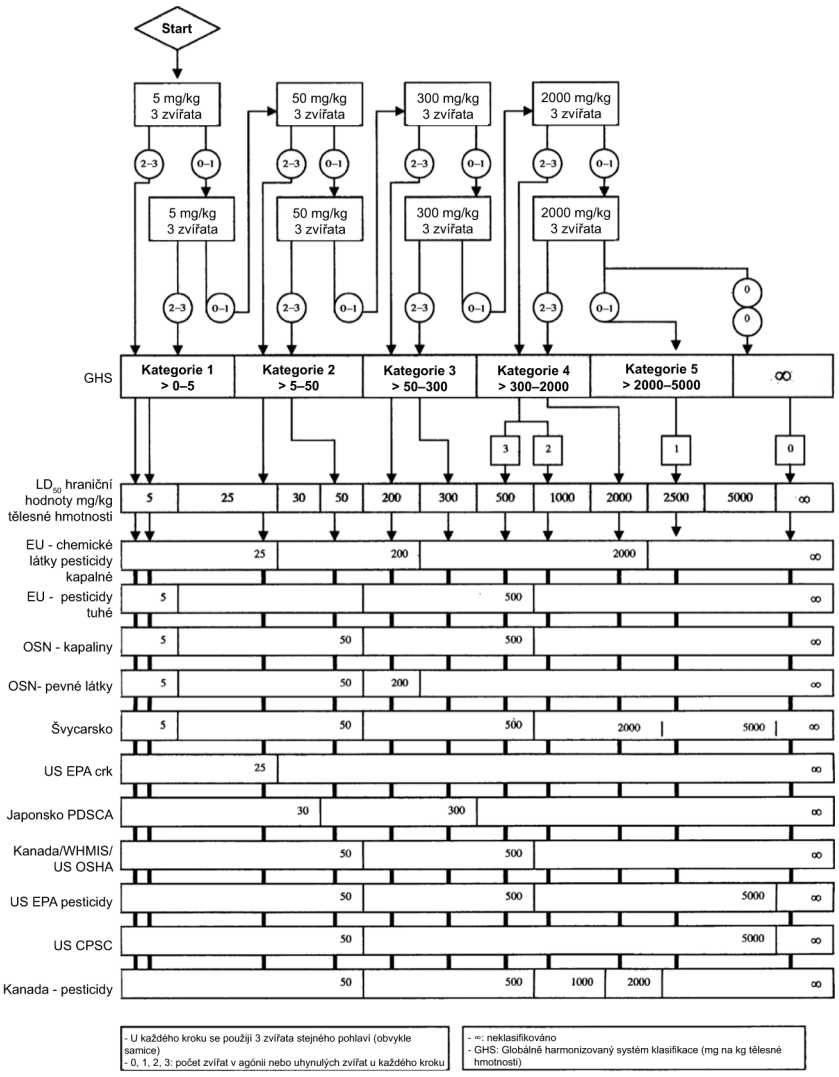
S ohledem na nutnost dodržování zásady dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení na zvířatech v kategorii 5 (5 000 mg/kg) nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví nebo zdraví zvířat (10). S vyššími úrovněmi dávek se žádné další zkoušky neprovedou.

Pokud je vyžadováno zkoušení s dávkou 5 000 mg/kg, vyžaduje se pouze jeden krok (tj. tři zvířata). Pokud první zvíře, jemuž byla podána dávka, uhyne, pokračuje podávání s úrovní 2 000 mg/kg podle vývojového diagramu v příloze 1. Pokud první zvíře přežije, podá se dávka dalším dvěma zvířatům. Pokud uhyne pouze jedno zvíře ze tří, očekává se, že hodnota LD_{50} přesáhne 5 000 mg/kg. Pokud uhynou obě zvířata, pokračuje se podáním dávky 2 000 mg/kg.

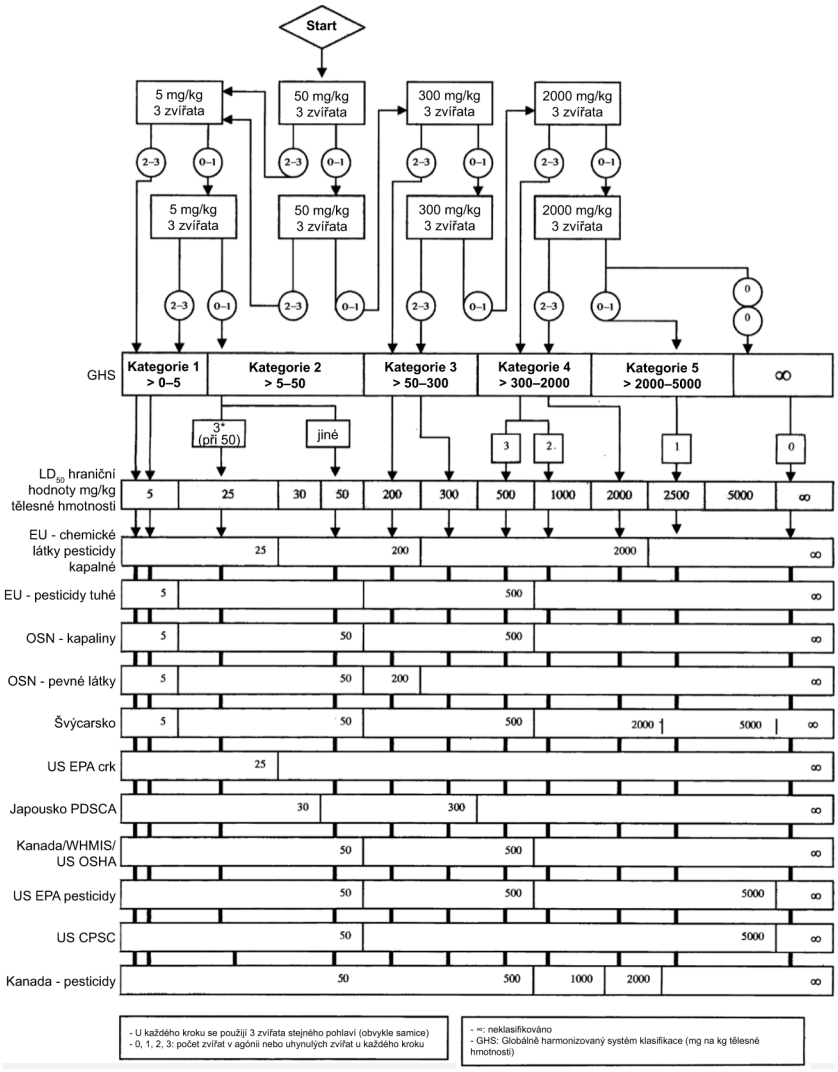
▼B

DODATEK 3

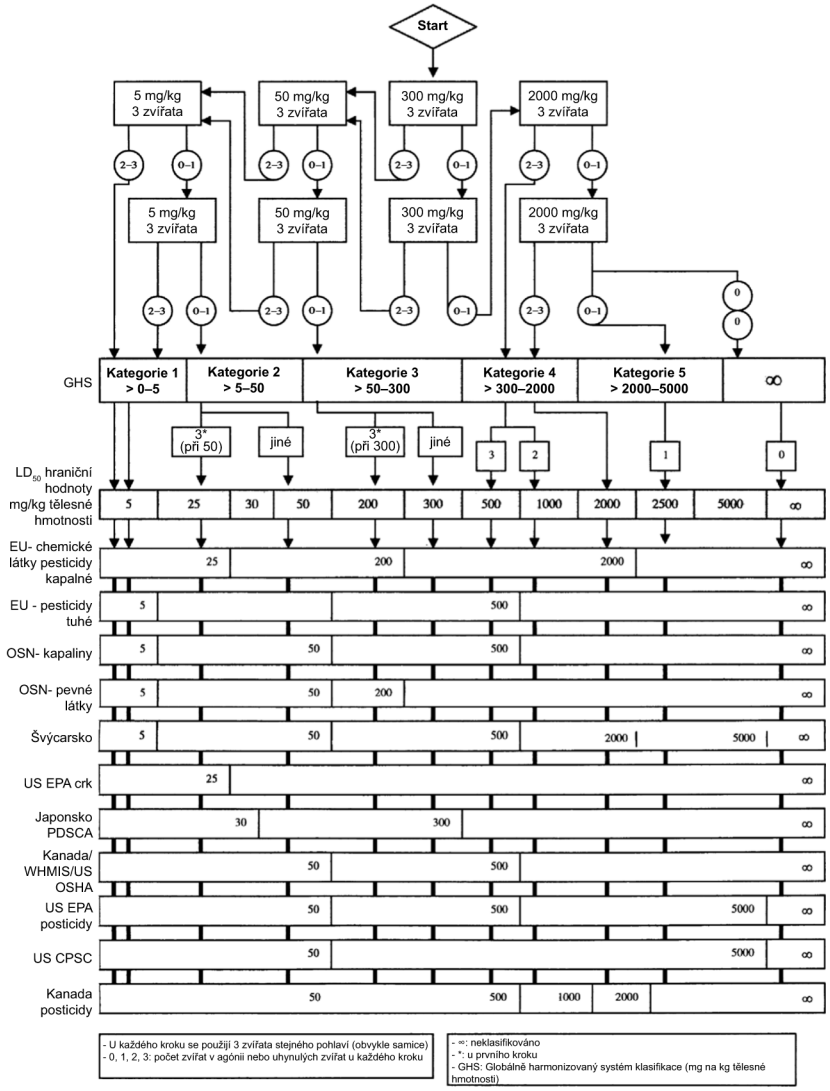
METODA ZKOUŠENÍ B.1.b: Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))



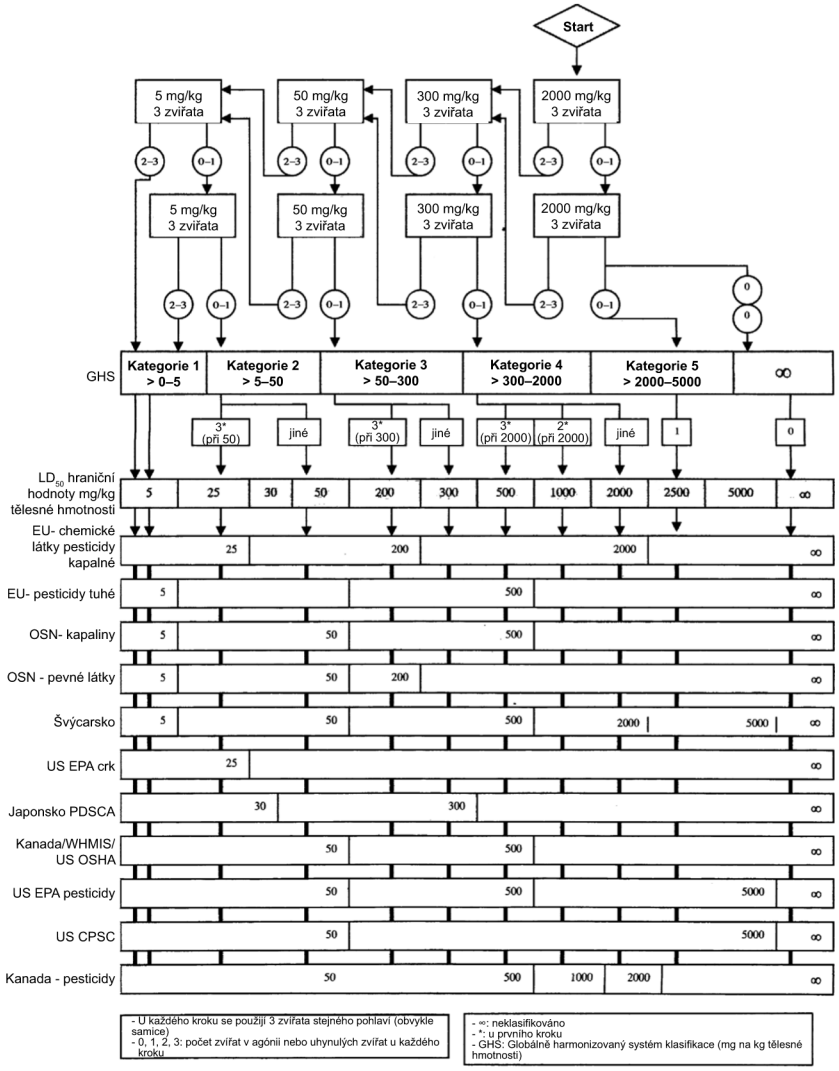
▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3
2
1
0
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
EU - chemické látky pesticidy kapalné
EU - pesticidy tuhé
OSN - kapaliny
OSN - pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japousko PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidy
US CPSC
Kanada - pesticidy
- U každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- «-»: neklasifikováno
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3* (při 300)
jiné
3
2
1
0
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
EU- chemické látky pesticidy kapalné
EU - pesticidy tuhé
OSN- kapaliny
OSN- pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/ WHMIS/US OSHA
US EPA posticidy
US CPSC
Kanada posticidy
- U každého kroku se použiji 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- *: u prvního kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3* (při 300)
3* (při 2000)
2* (při 2000)
1
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU- chemické látky pesticidy kapalné
EU- pesticidy tuhé
OSN- kapaliny
OSN - pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidy
US CPSC
Kanada - pesticidy
- U každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- *: u prvního kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼M4

B.2 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 403 (2009) (1). Původní Pokyny pro zkoušení 403 (TG 403) akutní inhalační toxicity byly schváleny v roce 1981. Revidovaná verze zkušební metody B.2 (odpovídá revidované verzi TG 403) popisovaná v této kapitole byla navržena tak, aby byla flexibilnější, omezila použití zvířat a splňovala regulační potřeby. Revidovaná verze zkušební metody uvádí dva typy studií: tradiční protokol LC_{50} a protokol koncentrace krát čas (C × t). Hlavními vlastnostmi této zkušební metody jsou schopnost poskytnout vztah mezi koncentrací a odezvou v rozmezí od neletálních až po letální výsledky, který umožňuje odvodit medián letální koncentrace (LC_{50}), prahovou hodnotu neletální koncentrace (např. LC01) a směrnici a určit možnou citlivost pohlaví. Protokol C × t by se měl použít v případě specifické regulační nebo vědecké potřeby, která vyžaduje zkoušky na zvířatech po několik časových období, např. pro účely plánování reakcí na nouzové situace [např. odvození hodnot směrodatných úrovní akutní expozice (AEGL), pokynů pro plánování reakce na nouzové situace (ERPG;) nebo prahových úrovní akutní expozice (AETL) nebo pro plánování využití půdy.

2. Pokyny k provádění a interpretaci studií používajících tuto zkušební metodu naleznete v Pokynech k zkouškám akutní inhalační toxicity (GD 39) (2).

3. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v GD 39 (2).

4. Tato zkušební metoda umožňuje chemickou charakterizaci a kvantitativní posouzení rizik a umožňuje rozdělit a klasifikovat zkoušené chemické látky podle nařízení (ES) č. 1272/2008 (3). Dokument GD 39 (2) uvádí pokyny pro výběr vhodné zkušební metody pro akutní zkoušky. Požadují-li se pouze informace o klasifikaci a označení, doporučuje se obvykle kapitola B.52 této přílohy (4) [viz GD 39 (2)]. Zkušební metoda B.2 není výslovně určena pro zkoušky speciálních materiálů, jako jsou špatně rozpustné kompozitní vláknové nebo izometrické částicové materiály či průmyslově vyráběné nanomateriály.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Zkušební laboratoř by měla dříve, než začne uvažovat o provedení zkoušek v souladu s touto zkušební metodou, vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, včetně stávajících studií (např. kapitola B.52 této přílohy (4)), jejichž výsledky by podpořily neprovádění dalších zkoušek, aby se minimalizovalo použití zvířat. Při výběru nejvhodnějších druhů, kmenů, pohlaví, způsobu expozice a vhodných zkušebních koncentrací mohou pomoci informace o identitě, chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, výsledcích jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaných použitích a potenciální expozici u člověka, jakož i dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách [viz GD 39 (2)].

▼M4

6. Zkouškám žíravých a/nebo dráždivých chemických látek při koncentracích, které podle očekávání způsobí intenzivní bolest a/nebo utrpení, by se mělo v co možná nejvyšší míře zabránit. Potenciál žíravosti/dráždivosti by se měl vyhodnotit na základě odborného posouzení informací získaných na základě zkušeností s účinky na člověka a zvířata (např. údaje ze studií s opakovanou dávkou provedených při nežíravých/dráždivých koncentracích), stávající údaje *in vitro* (např. z kapitol B.40, (5), B.40 BIS (6) této přílohy nebo OECD TG 435 (7)), hodnoty pH, informace o podobných látkách nebo jakékoli další relevantní údaje, za účelem prozkoumání, zda je možno od dalších zkoušek upustit. Pro specifické regulační potřeby (např. pro účely plánování reakce na nouzové situace) lze tuto zkušební metodu použít k expozici zvířat těmto materiálům, poněvadž vedoucímu studie nebo vedoucímu výzkumného týmu zajišťuje kontrolu nad výběrem cílových koncentrací. Cílové koncentrace by však neměly vyvolat intenzivní dráždivé/žíravé účinky, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit případ od případu a mělo by se poskytnout zdůvodnění zvolené koncentrace [viz GD 39 (2)].

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Tato revidovaná zkušební metoda B.2 byla navržena tak, aby umožnila získat dostatečné informace o akutní toxicitě zkoušené chemické látky pro její klasifikaci a poskytovala údaje o letalitě (např. $LC_{50,}$ LC_{01} a směrnici) pro obě pohlaví, které jsou potřebné pro kvantitativní posouzení rizik. Tato zkušební metoda nabízí dva způsoby, jak informace získat. Prvním je tradiční protokol, v němž jsou skupiny zvířat vystaveny mezní koncentraci (limitní zkouška) nebo sérii koncentrací v postupu prováděném po krocích po předem stanovenou dobu, obvykle 4 hodiny. Pro specifické regulační účely mohou být použity i jiné doby trvání expozice. Druhým je protokol (C × t), v němž jsou skupiny zvířat vystaveny jedné koncentraci (mezní koncentrace) nebo sérii několika koncentrací po různě dlouhou dobu.

8. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, by se měla humánně utratit a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem pokynů OECD č. 19 o humánních parametrech (8).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

9. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních plemen. Upřednostňovaným druhem je potkan, a pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

10. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den expozice by mělo jít o mladé dospělé jedince ve stáří 8 až 12 týdnů a jejich tělesná hmotnost by se u obou pohlaví měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti dříve exponovaných zvířat stejného stáří. Zvířata jsou náhodně vybrána a označena pro potřeby individuální identifikace. Zvířata se umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky. Zvířata by se také měla nechat po krátkou dobu před zahájením zkoušky zvyknout na zkušební zařízení, neboť to sníží stres způsobený novým prostředím.

▼M4

Zvířecí chov

11. Teplota v experimentální místnosti, v níž se zvířata chovají, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, což nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné je nechat zvyknout si na omezující trubičky. Zkumavky omezující pohyb by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo respirační objem za minutu. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, vyjma období expozice, spolu s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Inhalační komory

12. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž pod pojmem nazální se rozumí i expozice hlavy, nosu nebo tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obvykle upřednostňuje ve studiích kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

13. Expozice pouze nazální cestou mohou u potkanů trvat jakoukoli dobu až po 6 hodin. U myší by expozice pouze nazální cestou neměla obvykle přesáhnout 4 hodiny. Jsou-li nutné studie s delší dobou expozice, mělo by se uvést zdůvodnění [viz GD 39 (2)]. Zvířata vystavená aerosolům v komorách pro celotělovou expozici by se měla držet odděleně, aby se zabránilo pozření zkoušené chemické látky při vzájemné péči o srst s ostatními zvířaty v kleci. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

14. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba dbát na to, aby nevznikly explozivní koncentrace.

▼M4

Distribuce velikosti částic

15. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly by se měla stanovit velikost částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamických průměrů (MMAD) v rozmezí od 1 do 4 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v intervalu 1,5 až 3,0 (2) (9) (10). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění tohoto standardu, není-li to možné, je třeba poskytnout odborný posudek. Například kovové výpary mohou být menší než je tento standard a nabité částice, vlákna a hygroskopické materiály (které ve vlhkém prostředí dýchacích cest nabývají na velikosti) mohou být naopak větší.

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

16. K dosažení vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky v ovzduší lze použít nosič. Zpravidla by se měla dávat přednost vodě. Částicový materiál se může zpracovat mechanickými postupy, aby se dosáhlo požadované distribuce velikosti částic, avšak mělo by se zajistit, aby nedošlo k rozkladu nebo přeměně zkoušené chemické látky. Pokud lze předpokládat, že by mechanické postupy mohly změnit chemické složení zkoušené chemické látky (např. intenzivní mletí spojené s třením extrémně zvyšuje teplotu), mělo by se složení zkoušené chemické látky analyticky ověřit. Je třeba dostatečně dbát na to, aby se zkoušená chemická látka nekontaminovala. Nedrolivé zrnité materiály, které jsou záměrně zformulovány tak, aby je nebylo možno vdechnout, není třeba zkoušet. K prokázání skutečnosti, že při manipulaci se zrnitým materiálem nevznikají vdechovatelné částice, by se měla použít zkouška otěru. Pokud při zkoušce otěru vzniknou vdechovatelné částice, měla by se provést zkouška inhalační toxicity.

Kontrolní zvířata

17. Souběžná negativní kontrolní skupina (vystavená pouze vzduchu) není nutná. Používá-li se k vytvoření zkušební atmosféry jiný nosič než voda, měla by se kontrolní skupina s nosičem použít pouze tehdy, nejsou-li k dispozici dřívější údaje o inhalační toxicitě nosiče. Jestliže studie toxicity zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický, a kontrola s nosičem tudíž není nutná.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

18. Proudění vzduchu komorou by se mělo pečlivě řídit, neustále sledovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech při každé expozici. Monitorování koncentrace (nebo stability) látky ve zkušební atmosféře je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek k řízení všech důležitých parametrů generování dynamické atmosféry. V komorách určených k expozici pouze nazální cestou by se měl brát zvláštní ohled na to, aby se zamezilo opětovnému vdechování, v případech, kdy proudění vzduchu expozičním systémem není dostačující k zajištění dynamického proudění zkušební chemické atmosféry. Existují předepsané metodiky, které lze použít k prokázání skutečnosti, že za vybraných provozních podmínek nedochází k opětovnému vdechování (2) (11). Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Pokud se předpokládá, že se takový standard nedodrží, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit.

▼M4

Teplota a relativní vlhkost v komoře

19. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v zóně, kde zvířata dýchají, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla sledovat a zaznamenat alespoň třikrát při době expozice až 4 hodiny a každou hodinu při kratších expozicích. Relativní vlhkost by se měla v ideálním případě udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ale může se stát, že se nepodaří takovou hodnotu dosáhnout (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo nebude měřitelná v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

20. Pokud to je proveditelné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím komorovým systémem. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

21. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky v inhalační komoře v zóně, kde zvířata dýchají. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve formě, v níž se šíří vzduchem). U látek ve formě aerosolu, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze. Ve zprávě o studii by se měly uvést cílové, nominální a skutečné koncentrace, avšak k výpočtu hodnot letální koncentrace ve statistických analýzách se použijí pouze skutečné koncentrace.

22. Měla by se použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl skladovat za takových podmínek, aby se uchoval čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných příměsí a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost určená hmotnostní spektroskopií nebo plynovou chromatografií nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do jisté míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. pokud jde o barvu, fyzikální povahu apod.).

23. Expoziční atmosféra by se měla udržovat co nejstálejší a měla by se monitorovat buď nepřetržitě, nebo v pravidelných intervalech v závislosti na analytické metodě. Používá-li se odběr vzorků v pravidelných intervalech, měly by se vzorky atmosféry v komoře odebrat ve čtyřhodinové studii alespoň dvakrát. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, může se během celého období expozice odebrat jeden vzorek. Objeví-li se výrazné výkyvy mezi jednotlivými

▼M4

vzorky, měly by se u dalších zkoušených koncentrací použít čtyři vzorky na každou expozici. Koncentrace stanovená v jednotlivých vzorcích atmosféry v komoře by se neměla lišit od průměrné koncentrace o více než ± 10 % u plynů a par či o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována, a ta bere v úvahu dobu nutnou k dosažení t_{95}. Pokyny k výpočtu t_{95} jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

24. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře odlišně, proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušenou chemickou látkou směs, měla by se uvést i analytická koncentrace směsi, nikoliv pouze účinné látky nebo složky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

25. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla během čtyřhodinové expozice stanovit alespoň dvakrát pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic. Je-li možno prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie. Vedle primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/promývačka plynu, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat expozici. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází (viz odstavec 15).

POSTUP

26. Níže jsou popsány dva typy studie: tradiční protokol a protokol C × t. Oba protokoly mohou zahrnovat orientační studii, hlavní studii a/nebo limitní zkoušku (tradiční protokol) nebo zkoušku při mezní koncentraci (C × t). Je-li známo, že jedno pohlaví je citlivější, může se vedoucí studie rozhodnout provést tyto studie pouze u citlivého pohlaví. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Před zahájením zkoušky je třeba zvážit veškeré dostupné údaje, aby se minimalizovalo použití zvířat. Například použitím údajů získaných podle kapitoly B.52 této přílohy (4) je možné se provádění orientační studie vyhnout a může se jimi rovněž prokázat, zda je jedno pohlaví citlivější [viz GD 39 (2)].

▼M4

TRADIČNÍ PROTOKOL

Obecné úvahy: Tradiční protokol

27. V tradiční studii se skupiny zvířat vystaví zkoušené chemické látce po fixně dané časové období (obvykle 4 hodiny) buď v komoře pro expozici pouze nazální cestou nebo v komoře pro celotělovou expozici. Zvířata jsou vystavena buď mezní koncentraci (limitní zkouška) nebo alespoň třem koncentracím v postupných krocích (hlavní studie). Hlavní studii může předcházet studie orientační, pokud již nejsou o zkoušené chemické látce k dispozici nějaké informace, např. údaje z dříve provedené studie B.52 [viz dokument GD 39 (2)].

Orientační studie: Tradiční protokol

28. Orientační studie se používá k odhadu účinnosti zkoušené chemické látky, zjištění rozdílů v citlivosti jednotlivých pohlaví a k výběru úrovně expoziční koncentrace pro hlavní studii nebo limitní zkoušku. Při výběru úrovní koncentrací pro orientační studii by se měly použít veškeré dostupné informace, včetně dostupných údajů (Q)SAR a údajů o podobných chemických látkách. Každé koncentraci by se měli vystavit maximálně tři samci a tři samice (k stanovení rozdílu mezi pohlavími se obvykle používají od každého pohlaví 3 jedinci). Orientační studie může používat pouze jedinou koncentraci, avšak v případě potřeby je možné vyzkoušet více koncentrací. Orientační studie by neměla zkoušet tolik zvířat a koncentrací, aby připomínala hlavní studii. Namísto orientační studie je možné použít dříve provedenou studii B.52 (4) [viz dokument GD 39 (2)].

Limitní zkouška: Tradiční protokol

29. Limitní zkouška se používá v případě, že je o zkoušené chemické látce známo, že je prakticky netoxická, tj. vyvolává toxickou reakci pouze při koncentraci vyšší, než je regulační mezní koncentrace, nebo se to o ní předpokládá. Při limitní zkoušce se vystavuje jedna skupina tří samců a tří samic zkoušené chemické látce o mezní koncentraci. Informace o toxicitě zkoušené chemické látky lze získat ze znalostí o podobných zkoušených chemických látkách, vezme-li se v úvahu identita a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušená chemická látka bude toxická, by se měla provést hlavní zkouška.

30. Volba mezních koncentrací obvykle závisí na regulačních požadavcích. Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l (nebo maximální dosažitelná koncentrace) (3). Generovat mezní koncentrace některých zkoušených chemických látek může být technicky náročné, zejména ve formě par nebo aerosolů. Při zkoušení aerosolů by mělo být primárním cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (MMAD = 1–4 μm). U většiny zkoušených chemických látek je toho možno dosáhnout při koncentraci 2 mg/l. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze, pokud je možné dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (2)]. Nařízení (ES) č. 1272/2008 nedoporučuje zkoušky při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodů zajištění šetrného zacházení se zvířaty. O mezní koncentraci by se mělo uvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví (3) a že se ve zprávě o studii uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba zajistit, aby nedošlo k explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před limitní zkouškou provést jedna zkouška bez zvířat, kterou se zjistí, zda lze v komoře dosáhnout podmínek pro limitní zkoušku.

▼M4

31. Pokud je při mezní koncentraci pozorována mortalita či umírání, mohou výsledky limitní zkoušky sloužit jako orientační studie pro další zkoušky při jiných koncentracích (viz hlavní studie). Jestliže fyzikální nebo chemické vlastnosti zkoušené chemické látky znemožňují dosažení mezní koncentrace, měla by se zkoušet maximální dosažitelná koncentrace. Pokud při maximální dosažitelné koncentraci dojde k letalitě menší než 50 %, nejsou nutné žádné další zkoušky. Nelze-li dosáhnout mezní koncentrace, měly by se ve zprávě o studii uvést vysvětlující a podpůrné údaje. Jestliže maximální dosažitelná koncentrace páry nevyvolává toxicitu, může být zapotřebí generovat zkoušenou chemickou látku ve formě kapalného aerosolu.

Hlavní studie: Tradiční protokol

32. Hlavní studie se obvykle provádí s použitím pěti samců a pěti samic (nebo 5 zvířat citlivého pohlaví, je-li známo) pro každou koncentraci s tím, že se zkouší nejméně tři různé koncentrace. Zvolené koncentrace by měly být dostatečné, aby statistická analýza byla průkazná. Časový interval mezi exponovanými skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. S expozicí zvířat další úrovni koncentrace by se mělo vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve zkoušená zvířata přežila. To vedoucímu studie umožní upravit cílovou koncentraci pro další exponovanou skupinu. U inhalačních studií to však nemusí být vždy praktické, v důsledku závislosti na sofistikovaných technologiích, a tak by expozice zvířat na další úrovni koncentrace měla vycházet z předchozích zkušeností a vědeckého úsudku. Při zkouškách směsí je třeba nahlédnout do dokumentu GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRACE × ČAS (C × T)

Obecné úvahy: Protokol C × t

33. Při hodnocení inhalační toxicity se jako alternativa k tradičnímu protokolu může zvážit stupňovaná studie C × t (12) (13) (14). Tento přístup umožňuje vystavit zvířata zkoušené chemické látce na různých úrovních koncentrace a po několik časových období. Zkouška se provádí v komoře pro expozici pouze nazální cestou (celotělové komory nejsou pro tento protokol vhodné). Schéma postupu v dodatku 1 objasňuje tento protokol. Simulační analýzy prokázaly, že tradiční protokol i protokol C × t jsou oba schopny vést k průkazným hodnotám LC_{50}, avšak protokol C × t je obecně lepší pro získání průkazných hodnot LC_{01} a LC_{10} (15).

34. Simulační analýza prokázala, že použití dvou zvířat na každý interval C × t (jedno od každého pohlaví při použití obou pohlaví nebo dva jedinci citlivějšího pohlaví) může být obvykle dostačující při zkoušení 4 koncentrací a 5 dob expozice v hlavní studii. Za určitých okolností se může vedoucí studie rozhodnout použít dva potkany od každého pohlaví na každý interval C × t (15). Použití 2 zvířat od každého pohlaví pro každou koncentraci a časový bod může snížit zkreslení a variabilitu odhadů, zvýšit míru úspěšnosti odhadu a zlepšit pokrytí intervalu spolehlivosti. Nicméně v případě, kdy jsou údaje pro odhad nedostatečné (při použití jednoho zvířete od každého pohlaví nebo dvou zvířat citlivějšího pohlaví) může stačit rovněž 5. expoziční koncentrace. Další pokyny ohledně počtu zvířat a koncentrací, které se mají použít ve studii C × t, naleznete v dokumentu GD 39 (2).

▼M4

Orientační studie: Protokol C × t

35. Orientační studie se používá k odhadu účinnosti zkoušené chemické látky a k pomoci při výběru úrovní expoziční koncentrace pro hlavní studii. K výběru vhodné výchozí koncentrace pro hlavní studii a k minimalizaci počtu použitých zvířat může být zapotřebí provést orientační studii s použitím až tří zvířat/pohlaví/koncentrací [podrobnosti viz dodatek III dokumentu GD 39 (2)]. K stanovení rozdílu mezi pohlavími může být třeba použití tří zvířat od každého pohlaví. Tato zvířata by se měla vystavit látce po jedinou dobu trvání, obvykle 240 min. Schopnost generovat příslušnou zkušební atmosféru by se měla posoudit během předběžných technických zkoušek bez zvířat. Jsou-li k dispozici údaje o mortalitě ze studie B.52, není obvykle nutné provádět orientační studii. Při výběru první cílové koncentrace ve studii B.2 by měl vedoucí studie vzít v úvahu vzorce mortality pozorované v dostupných studiích B.52 (4) u obou pohlaví a při všech zkoušených koncentracích [viz dokument GD 39 (2)].

Počáteční koncentrace: Protokol C × t

36. Počáteční koncentrace (expoziční cyklus I) (dodatek 1) bude buď mezní koncentrace, nebo koncentrace zvolená vedoucím studie na základě orientační studie. Skupiny s jedním zvířetem od každého pohlaví jsou vystaveny této koncentraci po různě dlouhou dobu (např. 15, 30, 60, 120, nebo 240 minut), takže celkový počet zvířat je 10 (tomu se říká expoziční cyklus I) (dodatek 1).

37. Volba mezních koncentrací obvykle závisí na regulačních požadavcích. Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l (nebo maximální dosažitelná koncentrace) (3). Generovat mezní koncentrace některých zkoušených chemických látek může být technicky náročné, zejména ve formě par nebo aerosolů. Při zkoušení aerosolů by mělo být cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (tj. MMAD = 1–4 μm) při mezní koncentraci 2 mg/l. Toho je možné dosáhnout u většiny zkoušených chemických látek. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze, pokud je možné dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (2)]. Nařízení (ES) č. 1272/2008 odrazuje od zkoušek při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodů zajištění dobrých životních podmínek zvířat. O zkoušce při koncentraci převyšující mezní koncentraci by se mělo uvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví (3) a že se ve zprávě o studii uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před zkouškou při počáteční koncentraci provést jedna zkouška bez zvířat, aby se zajistilo, že lze v komoře dosáhnout podmínek pro tuto koncentraci.

38. Pokud se při počáteční koncentraci pozoruje mortalita či agonie, mohou výsledky při této koncentraci sloužit jako výchozí bod pro další zkoušky při jiných koncentracích (viz hlavní studie). Jestliže fyzikální nebo chemické vlastnosti zkoušené chemické látky znemožňují dosažení mezní koncentrace, měla by se testovat maximální dosažitelná koncentrace. Pokud při maximální dosažitelné koncentraci dojde k letalitě menší než 50 %, nejsou nutné žádné další zkoušky. Nelze-li dosáhnout mezní koncentrace, měly by se ve zprávě o studii uvést vysvětlující a podpůrné údaje. Jestliže maximální dosažitelná koncentrace páry nemá toxické účinky, může být zapotřebí generovat zkoušenou chemickou látku ve formě kapalného aerosolu.

▼M4

Hlavní studie: Protokol C × t

39. Počáteční koncentrace (Expoziční cyklus I) (Dodatek 1) zkoušená v hlavní studii bude buď mezní koncentrace, nebo koncentrace zvolená vedoucím studie na základě orientační studie. Jestliže byla během expozičního cyklu I nebo po ní pozorována mortalita, bude minimální expozice (C × t), která vede k mortalitě, použita jako vodítko k určení koncentrace a délek expozice pro expoziční cyklus II. Každý následující expoziční cyklus bude záviset na předcházejícím expozičním cyklu (viz dodatek 1).

40. U mnoha zkoušených chemických látek budou výsledky získané při počáteční koncentraci spolu s třemi dalšími expozičními cykly se souřadnicovou sítí o menším časovém kroku (tj. geometrické odstupňování dob expozice určené násobkem, jímž se liší po sobě jdoucí periody, obvykle $\sqrt{2}$) dostačující k stanovení vztahu mezi C × t a mortalitou (15), avšak může být užitečné použít i 5. expoziční koncentraci [viz dodatek 1 a dokument GD 39 (2)]. Matematické zpracování výsledků protokolu C × t naleznete v dodatku 1.

POZOROVÁNÍ

41. Během období expozice by se měla zvířata často klinicky sledovat. Po expozici by se měla provést klinická pozorování alespoň dvakrát v den expozice nebo častěji, pokud to naznačuje reakci zvířat na expozici, a poté alespoň jednou denně po dobu celkem 14 dní. Délka období sledování není stanovená pevně, ale měla by se určit na základě povahy a doby nástupu klinických příznaků a délky období zotavení. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity. Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře jednotlivě. Umírající zvířata a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení by se měla humánně utratit z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. Při vyšetřování klinických příznaků toxicity je třeba dbát na to, aby se počáteční špatný stav a přechodné respirační změny v důsledku postupu expozice neinterpretovaly mylně jako toxicita spojená se zkoušenou chemickou látkou, která by vyžadovala předčasné utracení zvířat. Měly by se vzít v úvahu principy a kritéria shrnuté v pokynech o humánních parametrech (GD 19) (7). Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

42. Pozorování v kleci se soustřeďují na změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je-li to možné, měly by se zaznamenat jakékoli rozdíly mezi místními a systémovými účinky. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci.

Tělesné hmotnosti

43. Hmotnosti jednotlivých zvířat by se měly zaznamenat jednou během období aklimatizace, v den expozice před expozicí (den 0), a minimálně v den 1, 3 a 7 (a poté jednou týdně) a v době uhynutí nebo utracení, pokud k němu dojde po dni 1. Tělesná hmotnost je uznávána jako zásadní ukazatel toxicity, a proto by se měla zvířata vykazující přetrvávající úbytek hmotnosti ≥ 20 % v porovnání s hodnotami před studií pečlivě sledovat. Na konci období po expozici se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

▼M4

Patologie

44. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu zajištění dobrého zacházení se zvířaty, by se měla podrobit pitvě. Není-li možné pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotách dostatečně nízkých k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

45. Je možné zvážit další vyšetření zahrnutá a priori v návrhu za účelem zvětšení interpretační hodnoty studie, např. měření hmotnosti plic přeživších potkanů a/nebo poskytnutí důkazů o podráždění pomocí mikroskopického vyšetření dýchacích cest. Mezi vyšetřované orgány mohou patřit také ty, které vykazují makroskopické patologické známky u zvířat přežívajících po 24 či více hodin a orgány, o nichž je známo nebo se očekává, že budou postiženy. Mikroskopické vyšetření celých dýchacích cest může poskytnout užitečné informace u zkoušených chemických látek, které reagují s vodou, například u kyselin a hygroskopických zkoušených látek.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

46. Měly by se uvést údaje o tělesné hmotnosti a pitevních nálezech pro každé jednotlivé zvíře. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

Protokol o zkoušce

47. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, světelné období a druh stravy,

— použitý druh/kmen a odůvodnění použití jiného druhu než potkan,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— podrobné údaje o kvalitě krmení a vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně krmení, karantény a léčby onemocnění.

▼M4

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a číslo v registru Chemical Abstract Services (CAS), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud se nepoužije voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně jejích rozměrů a objemu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení pro měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a úprava dodávaného/odsávaného vzduchu a systém použitý pro klimatizaci,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (nazální expozice), umístění zvířat v systému (celotělová expozice),

— homogenita/stabilita zkušební atmosféry v čase,

— umístění teplotních čidel, čidel vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry z komory,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— informace o zařízení použitém k měření kyslíku a oxidu uhličitého, používá-li se,

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95})

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

▼M4

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět v hmotnostních jednotkách (např. mg/l, mg/m^3, atd.), v závorce je možné uvést také hodnotu v objemových jednotkách (např. ppm, ppb, atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky. V případě, kdy mohly mechanické postupy změnit chemické složení zkoušené chemické látky, uveďte také výsledky analýz ověřujících složení zkoušené chemické látky,

— popis (nejlépe včetně nákresu) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

— hmotnosti jednotlivých zvířat ve studii, datum a čas uhynutí, pokud k němu došlo před plánovaným utracením, časový průběh nástupu příznaků toxicity a zda byly vratné u každého zvířete,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— odhady letality (např. LC_{50}, LD_{01}) včetně 95 % intervalů spolehlivosti a směrnice (pokud ji lze metodou hodnocení získat),

— statistická závislost včetně odhadu exponentu n (protokol C × t). Měl by se uvést název použitého statistického softwaru.

▼M4

Diskuse a interpretace výsledků

— Měl by se klást zvláštní důraz na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic.

— Je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možno splnit kritéria pro velikost částic.

— Mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (8).

— Bylo-li ve prospěch této zkušební metody B.2 přerušeno provádění zkoušky podle kapitoly B.52 této přílohy (4), mělo by se uvést zdůvodnění.

— V celkovém hodnocení studie by se měla popsat konzistentnost metod použitých k stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací.

— Měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo místní).

LITERATURA:

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

4) Kapitola B.52 této přílohy, Akutní inhalační toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity (ATC).

5) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška transkutánního elektrického odporu (TER).

6) Kapitola B.40bis této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška pomocí modelu lidské kůže.

7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion.. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 425, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs a. s. Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 1

Protokol C × t

1. Při hodnocení inhalační toxicity se jako alternativa k tradičnímu protokolu může použít vícestupňová studie C × t (12) (13) (14). Přednostně by se měla provádět v případě, kdy je pro specifické regulační nebo vědecké účely třeba provést zkoušky na zvířatech po několik časových období např. pro účely plánování reakce na nouzové situace nebo plánování využití půdy. Tento postup obvykle začíná zkouškou při mezní koncentraci (expoziční cyklus I), při níž se zvířata vystaví zkoušené chemické látce po pět různě dlouhých časových období (např. 15, 30, 60, 120 a 240 min.), takže se v rámci jediného expozičního cyklu získají údaje z několika různých časových období (viz obrázek 1). Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l. Tyto úrovně se smí překročit, pouze pokud je pro specifické regulační nebo vědecké účely třeba provést zkoušky na těchto úrovních (viz odstavec 37 v hlavním textu kapitoly B.2).

2. V situacích, kdy je k dispozici pouze málo informací o toxicitě zkoušené chemické látky nebo informace zcela chybí, měla by se provést orientační studie, v níž se obvykle po dobu 240 minut vystaví maximálně 3 zvířata od každého pohlaví cílovým koncentracím, které vybral vedoucí studie.

3. Jestliže se během expozičního cyklu I zkouší mezní koncentrace a je pozorována mortalita menší než 50 %, není třeba provádět žádné další zkoušky. Existuje-li regulační nebo vědecká potřeba stanovit vztah mezi koncentrací/časem/odezvou při vyšších úrovních, než je uvedená mezní koncentrace, měla by se další expozice provést při vyšší úrovni, například při dvojnásobku mezní koncentrace (tj. 2L na obrázku 1).

4. Jestliže je při mezní koncentraci pozorována toxicita, je třeba provést další zkoušky (hlavní studii). Tyto další expozice se provádějí buď při nižších koncentracích (na obrázku 1: expoziční cykly II, III nebo IV), nebo při vyšších koncentracích po kratší časová období (na obrázku 1: expoziční cyklus IV), přičemž tato časová období jsou upravena a není mezi nimi velký časový odstup.

5. Zkouška (počáteční koncentrace a dalších koncentrací) se provádí za použití 1 zvířete od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod nebo se 2 zvířaty citlivějšího pohlaví pro každou koncentraci/časový bod. Za určitých okolností se může vedoucí studie rozhodnout použít 2 potkany od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod (nebo 4 zvířata citlivějšího pohlaví pro každou koncentraci/časový bod) (15). Použití 2 zvířat od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod většinou sníží zkreslení a variabilitu odhadů, zvýší míru úspěšnosti odhadu a zlepší pokrytí intervalu spolehlivosti týkajícího se zde popsaného protokolu. Další podrobnosti jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

6. V ideálním případě se každý expoziční cyklus provede během jednoho dne. To dává možnost vyčkat s další expozicí, dokud není dostatečná jistota, že zvířata přežila, a vedoucímu studie to umožňuje upravit cílové koncentrace a doby expozice pro další expoziční cyklus. Doporučuje se zahájit každý expoziční cyklus skupinou, která bude látce vystavena po nejdelší dobu, např. se začne skupinou s 240minutovou expozicí, po ní následuje skupina s 120minutovou expozicí atd. Jestliže například zvířata v 240 minutové skupině po 90 minutách umírají nebo vykazují závažné příznaky toxicity (např. extrémní změny v dechovém vzorci jako třeba namáhavé dýchání), nemělo by smysl vystavovat další skupinu 120 minutové expozici, neboť mortalita by pravděpodobně činila 100 %. Vedoucí studie by měl proto pro takovou koncentraci zvolit kratší dobu expozice (např. 90, 65, 45, 33 a 25 minut).

▼M4

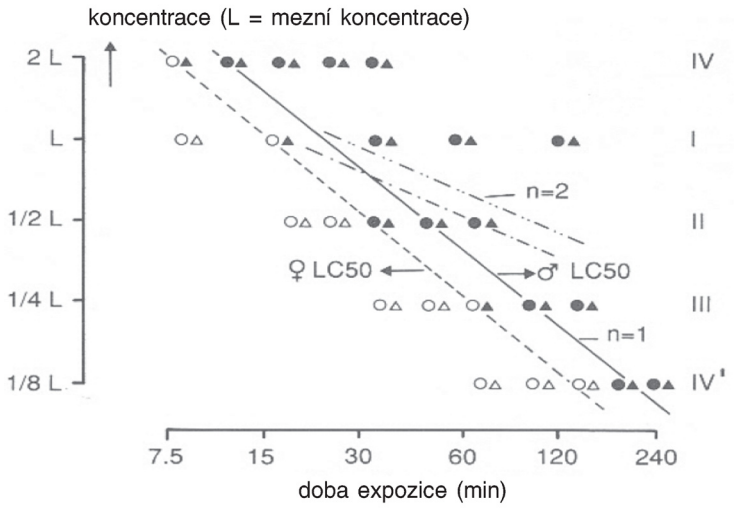
7. Koncentrace látky v komoře by se měla často měřit, aby se stanovil časem vážený průměr koncentrace pro každé trvání expozice. Kdykoli je to možné, měl by se v statistické analýze použít čas uhynutí každého zvířete (místo trvání expozice).

8. Výsledky prvních čtyř expozičních cyklů by se měly přezkoumat, aby se zjistily chybějící údaje na křivce závislosti koncentrace na čase (viz obrázek 1). V případě, že není dostatek údajů, lze provést další expozici (5. koncentrace). Koncentrace a doba expozice pro 5. expozici by se měly zvolit tak, aby pokryly tyto chybějící údaje.

9. Všechny expoziční cykly (včetně prvního expozičního cyklu) se použijí k výpočtu vztahu mezi koncentrací, časem a odezvou pomocí statistické analýzy (16). Je-li to možné, měly by se pro každý interval C × t použít časem vážené průměrné hodnoty koncentrace a doby expozice do uhynutí (dojde-li během expozice k uhynutí).

Obrázek 1

Hypotetické znázornění vztahu mezi koncentrací–časem–mortalitou u potkanů



Prázdné značky = zvířata, která přežila; plné značky = uhynulá zvířata

Trojúhelníčky = samice; kroužky = samci

Plná čára = hodnoty LC_{50} (rozmezí 7,5–240 min) pro samce, pokud n = 1

Přerušovaná čára = hodnoty LC_{50} (rozmezí 7,5–240 min) pro samice, pokud n = 1

Čerchované čáry = hypotetické hodnoty LC_{50} pro samce a samice, pokud n = 2 (12).

Slovníček pojmů

Koncentrace:

Doba expozice:

▼M4

10. Níže je uveden příklad postupu prováděného po krocích:

Expoziční cyklus I – zkouška při mezní koncentraci (viz obrázek 1)

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci / časový bod, celkem deset zvířat ([a])

— Cílová koncentrace ([b]) = mezní koncentrace.

— Vystavte pět skupin zvířat této cílové koncentraci po dobu 15, 30, 60, 120 a 240 minut.

↓

Expoziční cyklus II ([c]) **– hlavní studie**

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([d]) (1/2L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓

Expoziční cyklus III – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([4]) (1/4L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓

Expoziční cyklus IV' – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([4]) (1/8L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓ **nebo**

([a]) Nejsou-li k dispozici žádné informace o citlivosti jednotlivých pohlaví, použijí se potkani obou pohlaví, *tj.* 1 zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci. Pokud ze stávajících informací vyplývá, nebo pokud vyjde najevo během tohoto expozičního cyklu, že je jedno pohlaví citlivější, použije se během následujících zkoušek deset zvířat citlivějšího pohlaví (dvě zvířata pro každou koncentraci / časový bod) na každé úrovni koncentrace..

([b]) Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l. V případě očekávané toxicity nebo na základě výsledků orientační studie by se měly zvolit nižší počáteční koncentrace. Pro regulační nebo vědecké účely se mohou použít vyšší koncentrace.

([c]) V ideálním případě by se mělo s expozicí zvířat další úrovni koncentrace vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve exponovaná zvířata přežila. To umožní vedoucímu studie upravit cílovou koncentraci a doby expozice pro další expoziční cyklus.

([d]) Minimální dávka (koncentrace × čas), která vedla k mortalitě v průběhu zkoušky při počáteční koncentraci (první expoziční cyklus) se použije jako vodítko pro stanovení další kombinace koncentrace a dob expozice. Koncentrace se obvykle sníží na polovinu (1/2L) a zvířata se vystaví koncentraci v novém časovém rozmezí s kratším krokem s použitím geometrického dělení dob expozice faktorem 1,4 (√2; viz odkaz 11), které je rozloženo kolem doby odpovídající minimální úrovni letální dávky (čas × koncentrace) pozorované během první expozice. Na tomto obrázku (obrázek 1) byla mortalita při expozičním cyklu I poprvé pozorována při 15 minutách; doby expozice během expozičního cyklu II jsou proto rozmístěny okolo 30 minut a činí 15, 21 30, 42 a 60 min. Po prvních dvou expozicích se důrazně doporučuje vynést údaje do grafu podobně jako na výše uvedeném obrázku a zkontrolovat, zda má vztah mezi koncentrací a časem úhel 45 stupňů (n = 1) nebo zda je vztah mezi koncentrací–časem–odezvou méně strmý (např. n = 2) nebo strmější (např. n = 0,8). V posledně jmenovaném případě se důrazně doporučuje upravit příslušným způsobem další koncentrace a doby trvání expozice.

▼M4

Expoziční cyklus IV – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte vyšší koncentraci (e) (2L) po dobu expozice o něco kratší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

Matematické zpracování výsledků protokolu C × t

11. Postupem C × t provedeným se 4 nebo 5 expozičními koncentracemi a pěti různými dobami expozice se získá 20 nebo 25 bodů. Z těchto bodů lze pomocí statistické analýzy vypočítat vztah C × t (16):

Rovnice 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kde C = koncentrace, t = doba expozice nebo

Rovnice 2:

$$Odezva = f(C^n t)$$

kde $n = b_1/b_2$.

Pomocí rovnice 1 lze vypočítat hodnotu LC_{50} pro dané časové období (např. 4 hodiny, 1 hodina, 30 minut nebo jakékoli časové období v rozmezí zkoušených časových období) za použití P = 5 (50 % odezva). Haberův zákon však lze použít, pouze pokud n = 1. Hodnotu LC_{01} lze vypočítat za použití P = 2,67.

(e) V určitých případech může být nutné zvýšit koncentraci (2L) v novém časovém rozmezí s ještě kratším krokem s použitím geometrického dělení dob expozice faktorem 1,4 (√2), které je rozloženo kolem doby odpovídající minimální úrovni letální koncentrace pozorované během první expozice. Minimální doba expozice by měla být pokud možno delší než 5 minut, maximální doba expozice by neměla přesáhnout 8 hodin.

▼B

B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Následně se pozorují a zaznamenávají účinky a případy uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá nebo oholí srst na zádech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její prostupnost. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Při výběru vehikula se bere v úvahu jeho vliv na průnik zkoušené látky kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani nebo králíci. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Použijí se běžně používané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

▼B

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně pět zvířat. Mají být stejného pohlaví. Použijí-li se samice, musí být nullipary a nesmí být březí. Jsou-li k dispozici informace, že jedno z pohlaví je výrazně citlivější, použijí se zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Počet úrovní dávek má být dostatečný, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány, aby vznikly zkušební skupiny se zřetelným rozsahem toxických účinků a mortality. Při rozhodování o úrovních dávek by měly být vzaty v úvahu všechny dráždivé nebo žíravé účinky zkoušené látky. Získaná data by měla být dostatečná pro sestrojení závislosti dávka-odezva, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LD_{50}.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Lze provést limitní zkoušku s jednou dávkou nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na skupinách pěti samců a pěti samic, a to za použití výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděné mortalitě.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Zkoušená látka se po expoziční dobu 24 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit.

▼B

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Pozorování by se měla současně systematicky zaznamenávat. Záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

Posouzení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení zkoušky na jednom pohlaví se látka podá nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda nejsou zvířata druhého pohlaví na zkoušenou látku výrazně citlivější. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata pohlaví, které je zkoušeno, jsou výrazně citlivější, je možno zkoušení na zvířatech druhého pohlaví vynechat.

2. ÚDAJE

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví a zaznamená krátce před aplikací zkoušené látky, poté v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LD_{50} se vypočte pomocí uznávané metody.

Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxikologických účinků.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

▼B

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky (včetně způsobu očištění kůže a typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— pohlaví zvířat, jimž byla látka podána,

— údaje o odezvě podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla v průběhu zkoušky utracena, počet zvířat s příznaky toxicity, počet exponovaných zvířat),

— doba uhynutí po podání zkoušené látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,

— všechna pozorování,

— hodnota LD_{50} pro pohlaví, u něhož byla provedena úplná studie, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody stanovení),

— 95 % interval spolehlivosti pro LC_{50} (lze-li jej vypočítat),

— křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice, pokud to metoda stanovení umožňuje,

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— výsledky všech zkoušek na druhém pohlaví,

— rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LC_{50}),

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

▼B

B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 404 (2002).

1.1 ÚVOD

Při přípravě této modernizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení se zvířaty a vyhodnocování veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se zkouškám na laboratorních zvířatech, které nejsou nutné. Součástí této metody je doporučení, aby byla před provedením popsané zkoušky dráždivých a leptavých účinků látky na kůži *in vivo* vypracována analýza průkaznosti stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, lze je s využitím metody postupného zkoušení rozpracovat (1). Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a je popsána v příloze k této metodě. Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje, významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky látky, vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech a/nebo laboratorních zvířatech, důkazy leptavých nebo dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí takových látek, údaje dokládající silnou kyselost nebo zásaditost látky (2, 3) a výsledky validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* (4, 5, 5a). Tato analýza by měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u látek, u nichž již existují důkazy z jiných studiích, pokud jde o tyto dva ukazatele.

V příloze k této metodě je uvedena upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných a uznaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD (6), jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS) (7). Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky které lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

Pokud pomocí analýzy průkaznosti výsledků nelze o leptavých nebo dráždivých účincích rozhodnout, měla by se v souladu se strategií postupného zkoušení uvážit zkouška *in vivo* (viz dodatek).

▼B

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na kůži: vyvolání vratných změn na kůži do 4 hodin po aplikaci zkoušené látky.

Leptavé účinky na kůži: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete, přičemž oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria pro rozhodování o utracení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v literatuře (8).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava na zkoušku *in vivo***

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se mladá dospělá zvířata. Použití jiného druhu by mělo být zdůvodněno.

1.4.1.2 *Příprava zvířat*

Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků být 20 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

▼B

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží a rovnoměrné rozložení látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou látku požilo nebo vdechlo.

Zkoušené kapaliny se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být případně rozetřeny na prach) se zkoušená látka navlhčí co nejmenším množstvím vody (v případě potřeby jiným vhodným vehikulem), aby se zajistil dostatečný kontakt s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené látky na kůži pouze minimální.

Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 hodiny, se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

1.4.2.2 *Úroveň dávek*

Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné látky nebo pasty.

1.4.2.3 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži in vivo s použitím jednoho zvířete)*

Důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom zvířeti, zejména pokud existuje podezření, že látka má potenciální leptavé účinky. Tento postup je v souladu se strategií postupného zkoušení (viz dodatek 1).

Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků látka posouzena jako leptavá, není žádné další zkoušení na zvířatech nutné. U většiny látek, u nichž je podezření, že jsou leptavé, nejsou obvykle další zkoušky *in vivo* nutné. Avšak v těch případech, kdy je kvůli nedostatku důkazů považováno za nezbytné zjistit další údaje, mohou být v omezené míře provedeny zkoušky na zvířatech podle tohoto postupu: zvířeti se postupně přiloží nejvýše tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhá náplast po jedné hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, zvíře se pozoruje po dobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

▼B

V takových případech, kdy se u zkoušené látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

1.4.2.4 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži in vivo s dalšími zvířaty)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na dvou dalších zvířatech, u každého s jednou náplastí a dobou expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí zvíře. Sporné reakce je možné zhodnotit na dalších zvířatech.

1.4.2.5 *Doba pozorování*

Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

1.4.2.6 *Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže*

Všechna zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému, reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění náplasti. V počáteční zkoušce na jednom zvířeti se po odstranění náplasti okamžitě vyšetří také testované místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 hodinách nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Vedle pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). K objasnění sporných reakcí se zváží histopatologické vyšetření.

Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebním laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí (9).

2. **ÚDAJE**

2.1 PŘEDKLÁDÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečném protokolu o zkoušce. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v části 3.1.

▼B

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a závažností lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená látka za dráždivou.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

— popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,

— údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,

— popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,

— analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita),

— pokud jde o směs, její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albín králíka,

— počet zvířat každého pohlaví,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a v závěru zkoušky,

— stáří na začátku studie,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

▼B

Zkušební podmínky:

— technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast,

— podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,

— podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

— údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého zvířete v každém okamžiku měření,

— popis všech pozorovaných lézí,

— podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,

— popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Rozbor výsledků.

4. **LITERATURA**

1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.

3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.

4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

5a) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.

6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm).

9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Available from OECD Secretariat upon request].

▼B

Tabulka 1

HODNOCENÍ KOŽNÍCH REAKCÍ

Tvorba erytému a příškvaru

Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění sporných reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

▼B

DODATEK

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty je důležité vyhýbat se zbytečnému používání zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na kůži by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Je možné, že již existuje dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle její schopnosti vyvolávat leptavé nebo dráždivé účinky na kůži, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na laboratorních zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých nebo leptavých účinků látky na kůži zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než kožní studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a pomocí ní získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by měla být strategie postupného zkoušení využita k získání souboru údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich možných leptavých nebo dráždivých účinků. Strategie zkoušení popsaná v této příloze byla vypracována na semináři OECD (1) a později potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998 (2).

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.4, vyjadřuje doporučovaný postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na kůži. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje návod pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, které by před zahájením takové zkoušky měly být zváženy. Tato strategie představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých/leptavých účincích zkoušených látek a odstupňovaný přístup k vytváření relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Doporučuje se také za určitých okolností provést validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* na zjištění dráždivých/leptavých účinků na kůži.

POPIS STRATEGIE VYHODNOCOVÁNÍ A ZKOUŠENÍ

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (obrázek) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnoty pH), stávající informace by se měly vzít v úvahu jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích dotyčné látky nebo jejích obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie leptavých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

▼B

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení a/nebo údaje o zkouškách na zvířatech, např. z jednorázových nebo opakovaných studií dermální toxicity, protože z těchto údajů lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na kůži. Látky, jejichž dráždivé nebo leptavé účinky jsou známy, a látky, o nichž existují jednoznačné důkazy, že leptavé nebo dráždivé účinky nemají, není nutné zkoušet ve studiích *in vivo*.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka a/nebo zvířata naznačující, že mají schopnost leptavých/dráždivých účinků, lze předpokládat, že hodnocená zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nepředstavují podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz o neexistenci leptavých/dráždivých účinků látky. Ke stanovení potenciálních leptavých a dráždivých účinků na kůži by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2{,}0$ a $\geq 11{,}5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé účinky látky na kůži stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu) (3, 4). Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na kůži, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Dermální toxicita (krok 4). Pokud se ukáže, že chemická látka je při podání dermální cestou vysoce toxická, nebude se provádět studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, neboť množství zkoušené látky, které se obvykle nanáší, by mohlo přesáhnout vysoce toxickou dávku a mít za následek uhynutí nebo značné utrpení zvířat. Navíc pokud byly studie dermální toxicity využívající albíny králíka již provedeny do limitní úrovně dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší a nebyly zjištěny žádné dráždivé nebo leptavé účinky, nebudou další zkoušky dráždivých/leptavých účinků na kůži zřejmě nutné. Při hodnocení akutní dermální toxicity v předchozích studiích je třeba mít na paměti několik aspektů. Např. zaznamenané informace o dermálních lézích nemusí být úplné. Zkoušení a pozorování mohlo být prováděno na jiných druzích než králík a citlivost reakcí jednotlivých druhů se může do značné míry lišit. Také forma zkoušené látky, která byla zvířatům podávána, možná nebyla vhodná pro hodnocení dráždivých/leptavých účinků na kůži (např. ředění látek určených ke zkoušení dermální toxicity) (5). Avšak v takových případech, kdy byly na králících provedeny dobře navržené a realizované studie dermální toxicity, lze negativní nálezy považovat za dostatečné důkazy, že látka není žíravá nebo dráždivá.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé účinky ve validované a uznané zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo* (6, 7), jejímž cílem bylo hodnocení specifických účinků, není nutné zkoušet na zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky.

▼B

Zkouška in vivo na králících (kroky 7 a 8). Pokud je k provedení zkoušení *in vivo* nutné rozhodnutí založené na průkaznosti výsledku, mělo by toto zkoušení začínat s počáteční zkouškou na jednom zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé účinky na kůži, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit maximálně na dvou dalších zvířatech po dobu expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně.

LITERATURA

1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709–720.

4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) s. 19–26.

5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411–436.

6) Zkušební metoda B.40.

7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

▼B

Obrázek

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive* ↓		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage* ↓		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 405 (2002).

1.1 ÚVOD

Při přípravě této modernizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením, jichž lze dosáhnout vyhodnocováním veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na laboratorních zvířatech a zohlednit tak zásadu dobrého zacházení se zvířaty. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky akutních dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti (1) stávajících relevantních údajů. Pokud nejsou k dispozici dostatečné údaje, doporučuje se získat je pomocí metody postupného zkoušení (2, 3). Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a schválených zkoušek *in vitro* a je popsána v příloze k této metodě zkoušení. Navíc se před zvažováním očního testu *in vivo* doporučuje provést zkoušku dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, na jejímž základě se předpoví možné leptavé účinky na oči.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se ke zkouškám *in vivo* nemělo přistupovat, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro možné leptavé/dráždivé účinky látky na oči vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech a/nebo laboratorních zvířatech, důkazy leptavých/-dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí těchto látek, údaje dokládající vysokou kyselost nebo zásaditost látky (4, 5) a výsledky validovaných a uznaných zkoušek leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vitro* nebo *ex vivo* (6, 6a). Tyto studie mohly být vypracovány před analýzou průkaznosti výsledků nebo na základě zjištění této analýzy.

U některých látek může taková analýza naznačovat nutnost provedení studií možných leptavých/dráždivých účinků látky na oči *in vivo*. Ve všech takových případech se před zvážením použití oční zkoušky *in vivo* nejprve provede studie účinků látky na kůži *in vivo* a zhodnotí se v souladu s metodou zkoušení B.4 (7). Použití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení by mělo omezit potřebu zkoušení leptavých/dráždivých účinků na oči u těch látek, u nichž tyto účinky byly již dostatečně doloženy v jiných studiích. Pokud pomocí strategie postupného zkoušení nelze o možnosti leptavých nebo dráždivých účinků na oči rozhodnout ani po provedení studie leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vivo*, lze provést zkoušku leptavých/dráždivých účinků na oči *in vivo*.

▼B

Upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo,* je uvedena v příloze k této metodě zkoušení. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD (8), jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS) (9). Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých poznatků o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži a oči není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na oči: vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Leptavé účinky na oči: vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V předem určených intervalech se na základě lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíší se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utracení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v literatuře (10).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava na zkoušku *in vivo***

1.4.1.1 *Výběr živočišných druhů*

Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiných kmenů nebo druhů je třeba zdůvodnit.

1.4.1.2 *Příprava zvířat*

24 hodin před zkouškou se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky, se nepoužijí.

▼B

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Zvířata se chovají samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C (±3 °C), relativní vlhkost vzduchu minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem však je hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

1.4.2.2 *Výplach*

Oči pokusných zvířat se do 24 hodin po instilaci zkoušené látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek (viz část 1.4.2.3.2) a okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků. Po 24 hodinách je možné v případě potřeby oči vypláchnout.

Použití satelitní skupiny zvířat k vyšetření vlivu výplachu očí se nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno. Je-li satelitní skupina nezbytná, použijí se dva králíci. Podmínky výplachu se podrobně zdokumentují, např. doba výplachu, složení a teplota promývacího roztoku, trvání, objem a rychlost aplikace.

1.4.2.3 *Úroveň dávek*

1.4.2.3.1 *Zkoušení kapalin*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. K instilaci látky přímo do oka by se neměly používat aerosolové rozstřikovače s čerpadlem. Před instilací 0,1 ml do oka by se měla tekutina z rozstřikovače vypudit a shromáždit do nádobky.

1.4.2.3.2 *Zkoušení pevných látek*

Při zkoušení pevných látek, past a látek obsahujících částice se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost nejvýše 100 mg. Zkoušená látka se rozemele na jemný prášek. Objem pevného materiálu se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrnou nádobkou. Pokud nebyla zkoušená pevná látka odstraněna z oka pokusného zvířete pomocí fyziologických mechanismů do doby prvního pozorování po 1 hodině po aplikaci, lze oko vypláchnout fyziologickým roztokem nebo destilovanou vodou.

▼B

1.4.2.3.3 *Zkoušení aerosolů*

Před instilací látek do oka se doporučuje zachytit látky obsažené v rozstřikovačích nebo aerosolech do nádobky. Jedinou výjimkou jsou látky obsažené v aerosolové nádobce pod tlakem, které z důvodu odpařování zachytit nelze. V takových případech se oko podrží otevřené a látka se do oka aplikuje přímým vstříknutím trvajícím jednu sekundu ze vzdálenosti 10 cm. Vzdálenost se může lišit podle tlaku v rozprašovači a jeho obsahu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození oka tlakem z rozprašovače. Případně bude nutné vyhodnotit možnost „mechanického“ poškození oka v důsledku rozprašovacího tlaku.

Dávku aerosolu lze odhadnout na základě této simulované zkoušky: látka se nastříká na odvažovací papír otvorem o velikosti králičího oka, který se nachází bezprostředně před papírem. Na základě zvýšení hmotnosti papíru se odhadne množství látky, která se vstříkne do oka. U těkavých látek lze dávku odhadnout pomocí zvážení odběrové nádobky před odstraněním zkoušené látky a po jejím odstranění.

1.4.2.4 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na oči in vivo na jednom zvířeti)*

Jak je uvedeno ve strategii postupného zkoušení (viz dodatek 1), důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom zvířeti.

Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči při použití popsaného postupu, další zkoušení dráždivých účinků na oči se neprovádí.

1.4.2.5 *Lokální anestetika*

V jednotlivých případech lze použít lokální anestetika. Pokud analýza průkaznosti výsledků naznačuje, že látka může způsobit bolest, nebo pokud počáteční zkoušky ukazují, že se objeví bolestivá reakce, lze před instilací zkoušené látky použít lokální anestetika. Typ, koncentraci a dávku lokálního anestetika je třeba pečlivě zvolit, aby bylo zajištěno, že v důsledku jeho použití nedojde k odlišné reakci na zkoušenou látku. Podobně se musí znecitlivět i kontrolní oko.

1.4.2.6 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na oči in vivo na dalších zvířatech)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na maximálně dalších dvou zvířatech. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován značný dráždivý účinek, který naznačuje možný silný (nevratný) účinek v potvrzující zkoušce, doporučuje se provést potvrzující zkoušku metodou postupného zkoušení na jednom zvířeti spíše než exponováním dalších dvou zvířat současně. Pokud se u druhého zvířete projeví leptavé nebo vysoce dráždivé účinky, ve zkoušce se nepokračuje. K potvrzení slabých nebo mírných dráždivých reakcí bude případně nutné použít další zvířata.

▼B

1.4.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit míru a vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena vždy, pokud zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení (9). Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla obvykle pozorovat 21 dnů po podání zkoušené látky. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 21 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.7.1 *Klinická pozorování a hodnocení očních reakcí*

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 hodinách po podání zkoušené látky. Jakmile se získají konečné informace, nemělo by zkoušení na zvířatech probíhat déle, než je nezbytné. Zvířata se známkami přetrvávajícího utrpení nebo značných bolestí se neprodleně humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Humánně se utratí ta zvířata, u nichž došlo po instilaci k těmto očním lézím: perforace rohovky nebo výrazné zvředovatění rohovky včetně stafylomu; krev v přední komoře oční; zákal rohovky stupně 4 přetrvávající 48 h; absence reakce na osvit (reakce duhovky stupně 2) přetrvávající 72 hodin; zvředovatění spojivkové membrány; nekróza spojivek nebo slzné žlázy; nebo odlupování nekrotické hmoty. Tento postup je dán nevratností takových lézí.

Zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Zvířata s mírnými až středními lézemi se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Po 7, 14 a 21 dnech se provádí pozorování, aby se určil stav lézí a jejich vratnost nebo nevratnost.

Stupeň reakce oka (spojivek, rohovky a duhovky) je třeba zaznamenat při každém vyšetření (tabulka 1). Uvedou se také jakékoli jiné oční léze (např. panus, zbarvení) nebo nežádoucí systémové účinky.

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční štěrbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 hodin mohou být oči zvířat dále vyšetřeny fluoresceinem.

Hodnocení očních reakcí je nutně subjektivní. s cílem podporovat harmonizaci hodnocení očních reakcí a napomáhat zkušebním laboratořím a těm, kteří provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování.

2. **ÚDAJE**

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stupně dráždivých účinků na oči se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které jsou smysluplné, pouze pokud se opírají o úplný popis a hodnocení veškerých pozorování.

▼B

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

— popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,

— údaje získané v každém kroku strategie zkoušení,

— popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,

— popis provedené studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, včetně získaných výsledků,

— analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. hodnota pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, reaktivita s vodou),

— v případě směsi její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech,

— je-li použito lokální anestetikum, jeho identifikace, čistota, typ, dávka a možná interakce se zkoušenou látkou.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albín králíka,

— stáří každého zvířete na začátku studie,

— počet zvířat každého pohlaví ve zkušebních a kontrolních skupinách (je-li to nutné),

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,

— původ, podmínky chovu, strava atd.

Výsledky:

— popis metody vyhodnocení dráždivosti při každém pozorování (např. ruční štěrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),

▼B

— údaje ve formě tabulky o reakcích na dráždivé nebo leptavé účinky u jednotlivých zvířat při každém pozorování až do vyjmutí každého zvířete ze zkoušky,

— podrobný popis stupně a charakteru pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků,

— popis všech dalších pozorovaných očních lézí (např. vaskularizace, tvorba zánětu rohovky, srůst sousedních tkání, zbarvení),

— popis místních a systémových nepříznivých účinků mimo oči a případné histopatologické nálezy.

Diskuse a interpretace výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Extrapolace výsledků studií dráždivých účinků na oči laboratorních zvířat na člověka je platná jen v omezené míře. Albín králíka je ve většině případů na dráždivé a leptavé látky citlivější než člověk.

Je třeba dbát na to, aby byla při interpretaci údajů vyloučena dráždivost pramenící ze sekundární infekce.

4. **LITERATURA**

1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.

4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.

5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

6a) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.

7) Zkušební metoda B.4. Akutní toxicita: dráždivé/leptavé účinky na kůži.

8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabulka 1

STUPNICE OČNÍCH LÉZÍ

Rohovka

Zákal: stupeň hustoty (vyšetří se nejvíce zakalené oblasti) (*)

Žádné zvředovatění ani zákal	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti zákalu (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné, velikost zornice stěží rozeznatelná	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

Maximálně možné: 4

POZNAMKY

(*) Zaznamená se oblast zákalu rohovky.

Duhovka

Normální	0
Výrazně prohloubené řasy, městnání, otoky, střední překrvení kolem rohovky nebo překrvení při zánětu; rohovka reaguje na světlo (zpožděná reakce je považována za účinek)	1
Krvácení, makroskopické poškození nebo bez reakce na světlo	2

Maximálně možné: 2

Spojivky

Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce, kromě rohovky a duhovky)

Normální	0
Některé krevní cévy hyperemické (překrvené)	1
Difúzní, rudá barva, jednotlivé cévy nesnadno rozeznatelné	2
Difúzní temně rudá barva	3

Maximálně možné: 3

Chemóza

Otoky (týká se víček a/nebo slzných žláz)

Normální	0
Slabě abnormální otok	1
Patrný otok, s částečným obrácením víček	2
Otok způsobující uzavření víček zhruba na polovinu	3
Otok způsobující uzavření víček více než na polovinu	4

Maximálně možné: 4

▼B

Dodatek

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na oči

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty je důležité vyhýbat se zbytečnému používání zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejích potenciálních dráždivých nebo leptavých účinků na oči, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na laboratorních zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých a leptavých účinků látky na oči zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie, jiné než oční studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a jejím prostřednictvím získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by se měla strategie postupného zkoušení využít k získání údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich leptavých nebo dráždivých účinků na oči. Strategie zkoušení popsaná v této příloze byla vypracována na semináři OECD (1). Následně byla tato strategie potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998 (2).

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.5, vyjadřuje doporučovaný postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na oči. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo*. Metoda zkoušení obsahuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, kterým je nutno před zvažováním takové zkoušky věnovat pozornost. Strategie postupného zkoušení představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých a leptavých účincích látek na oči a odstupňovaný přístup k získávání relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Součástí této strategie je provedení nejprve validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* a poté za určitých okolností provedení studií dráždivých/leptavých účinků na kůži metodou zkoušení B.4 (3, 4).

POPIS STRATEGIE ZKOUŠENÍ PO KROCÍCH

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (obrázek) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze podstatné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly hodnotit jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích zkoušené látky a jejích strukturních obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků, toto rozhodnutí se zdůvodní. Zvláštní důraz bude kladen na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

▼B

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení a/nebo údaje o zkouškách na zvířatech získaná z očních studií, protože z těchto dat lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na oči. Poté se zhodnotí dostupné údaje ze studií na lidech a/nebo na zvířatech zabývajících se leptavými/dráždivými účinky na kůži. Látky, jejichž leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči jsou známy, se do očí zvířat neaplikují. To platí rovněž pro látky vykazující leptavé nebo dráždivé účinky na kůži; takové látky se považují za látky s leptavými a/nebo dráždivými účinky rovněž na oči. Látky, o nichž byly v předchozích očních studiích získány dostatečné důkazy, že jsou nežíravé a nedráždivé, se v očních studiích *in vivo* také nezkoušejí.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných chemických látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka a/nebo zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků na oči, lze předpokládat, že zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz nežíravosti/nedráždivosti látky. Ke stanovení potenciálu leptavých/dráždivých účinků na kůži i oči by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq$ 2,0 nebo $\geq$ 11,5 mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé nebo dráždivé účinky látky na oči stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu) (5, 6). Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že látka zřejmě nemá leptavé účinky na oči, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Zvážení dalších existujících informací (krok 4). V této fázi se vyhodnotí veškeré dostupné informace o systémové toxicitě dermální cestou. Vezme se v úvahu také akutní dermální toxicita zkoušené látky. Pokud se u zkoušené látky ukázalo, že je při podání dermální cestou vysoce toxická, není nutné zkoušet ji na oku. Ačkoliv mezi akutní dermální toxicitou a dráždivými/leptavými účinky na oči nemusí nezbytně existovat souvislost, lze se domnívat, že pokud je látka při podání dermální cestou vysoce toxická, bude vysokou toxicitu vykazovat také při instilaci do oka. Takové údaje lze také vzít v úvahu mezi kroky 2 a 3.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé vlastnosti ve zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo* (7, 8), která byla validována a uznána pro hodnocení výlučně leptavých/dráždivých účinků na oči nebo na kůži, není nutné zkoušet na zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky. Nejsou-li validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo k* dispozici, kroky 5 a 6 se přeskočí a přejde se přímo ke kroku 7.

Posouzení dráždivých nebo leptavých účinků na kůži in vivo (krok 7). Pokud stávající důkazy k provedení přesvědčivé analýzy průkaznosti výsledků potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči opírající se o údaje z výše uvedených studií nepostačují, nejprve se s využitím metody B.4 (4) a průvodní přílohy (9) vyhodnotí potenciál dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Jestliže se u látky prokáží leptavé nebo silně dráždivé účinky na kůži, považuje se za látku s leptavými a dráždivými účinky na oči, pokud jiné informace nesvědčí o odlišném závěru. Oční zkoušku *in vivo* by tak nebylo nutné provádět. Pokud látka leptavé nebo výrazně dráždivé účinky na kůži nemá, oční zkouška *in vivo* se provede.

▼B

Zkouška *in vivo* na králících (kroky 8 a 9). Oční zkoušení *in vivo* se zahájí počáteční zkouškou na jednom zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má silně dráždivé nebo leptavé účinky na oči, další zkoušení se neprovádí. Pokud zkouška žádné leptavé nebo silně dráždivé účinky neodhalí, provede se potvrzující zkouška na dvou dalších zvířatech.

LITERATURA

1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.

4) Zkušební metoda B.4. Akutní toxicita: dráždivé/leptavé účinky na kůži.

5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.

6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

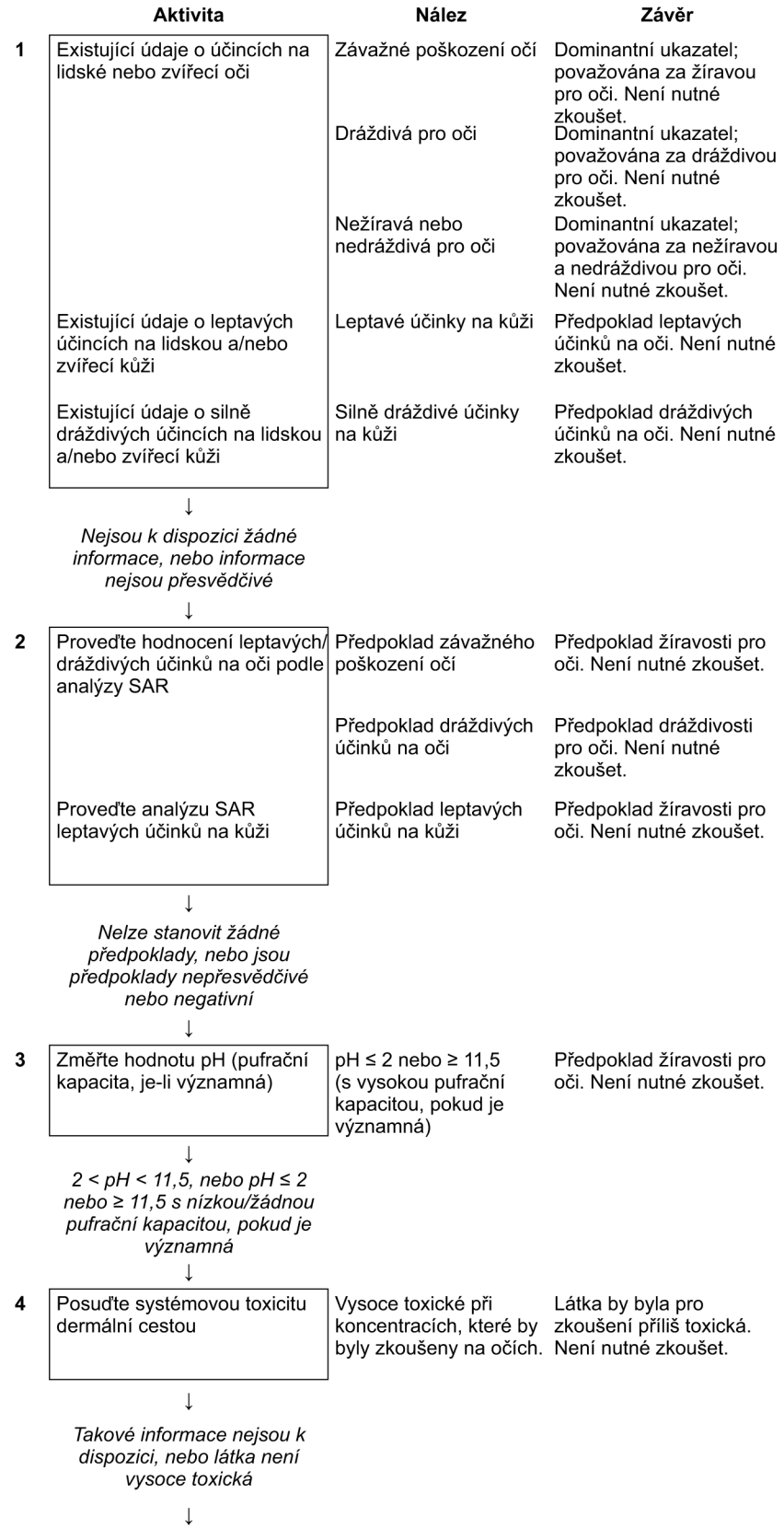
8) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.

9) Dodatek zkušební metody B.4: Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži.

▼B

Obrázek

Strategie zkoušení a hodnocení dráždivých/leptavých účinků na oči



▼B

5	Proveďte validovanou a uznanou zkoušku leptavých účinků na oči *in vitro* nebo *ex vivo*	Leptavé účinky	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Látka není žíravá, nebo validované metody zkoušení žíravosti pro oči in vitro *nebo* ex vivo *dosud nejsou k dispozici*		
	↓		
6	Proveďte validovanou a uznanou zkoušku dráždivých účinků na oči *in vitro* nebo *ex vivo*	Dráždivé účinky	Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Látka není dráždivá, nebo validované metody zkoušení dráždivých účinků na oči in vitro *nebo* ex vivo *dosud nejsou k dispozici*		
	↓		
7	Experimentálně vyhodnoťte potenciál dráždivých nebo leptavých účinků na kůži *in vivo* (viz metoda zkoušení B.4, včetně její přílohy)	Leptavé nebo silně dráždivé účinky	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Látka není žíravá ani silně dráždivá pro kůži		
	↓		
8	Proveďte počáteční oční zkoušku na králících *in vivo* na jednom zvířeti	Závažné poškození očí	Považována za dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Žádné výrazné poškození, nebo žádná odezva		
	↓		
9	Proveďte potvrzující zkoušku na jednom nebo dalších dvou zvířatech	Žíravá nebo dráždivá	Považována za žíravou nebo dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
		Nežíravá nebo nedráždivá	Považována za nedráždivou a nežíravou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.

▼B

B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE

1. METODA

1.1 ÚVOD

Poznámky:

Citlivost zkoušek a jejich schopnost zjistit látky s možným senzibilizačním účinkem na lidskou kůži mají v systému klasifikace toxicity v oblasti veřejného zdraví velký význam.

Neexistuje jediná zkušební metoda, která by vhodným způsobem identifikovala všechny látky s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži a která by byla relevantní pro všechny látky.

Při výběru zkoušky musí být zváženy faktory, jako jsou fyzikální vlastnosti látky, včetně schopnosti pronikat kůží.

Byly vyvinuty dva typy zkoušek na morčatech: zkoušky s adjuvanty, ve kterých je alergický stav umocněn rozpuštěním nebo suspendováním zkoušené látky ve Freundově kompletním adjuvantu (FCA), a zkoušky bez adjuvantů.

Zkoušky s adjuvantem jsou pravděpodobně přesnější v předpovědi pravděpodobného senzibilizačního účinku na lidskou kůži než metody bez použití Freundova kompletního adjuvantu, a proto se jim dává přednost.

Maximalizační zkouška na morčatech (Guinea Pig Maximisation Test – GPMT) je velmi rozšířená zkouška s adjuvantem. Ačkoli lze použít několik dalších metod pro zjištění schopnosti látky vyvolat senzibilizační reakci kůže, je zkouška GMPT upřednostňovanou technikou s adjuvantem.

U mnoha skupin chemických látek jsou zkoušky bez adjuvantu (dává se přednost Bühlerově zkoušce) považovány za méně citlivé.

V určitých případech lze zdůvodnit Bühlerovu zkoušku s povrchovou aplikací spíše než intradermální injekci používanou v maximalizační zkoušce na morčatech. Pro použití Bühlerovy zkoušky by mělo být uvedeno vědecké zdůvodnění.

V této metodě jsou popsány maximalizační zkoušky na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška. Jiné metody lze použít za předpokladu, že jsou spolehlivě validované a odborně odůvodněné.

Pokud je z uznávané screeningové zkoušky získán pozitivní výsledek, může být zkoušená látka označena za potenciální senzibilizátor a nemusí být nezbytné provést další zkoušku na morčatech. Jestliže však má taková zkouška negativní výsledek, musí být zkouška na morčatech provedena za použití postupu popsaného v této zkušební metodě.

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 DEFINICE

Senzibilizace kůže: (alergická kontaktní dermatitida) je imunologicky zprostředkovaná kožní reakce na látku. U člověka mohou být reakce charakterizovány svěděním, zarudnutím kůže, otoky, pupenci, puchýřky, bulami nebo jejich kombinací. U jiných živočišných druhů se mohou reakce lišit a může být zjištěno pouze zarudnutí kůže nebo otok.

Indukční expozice: experimentální expozice subjektu zkoušené látce se záměrem navodit stav přecitlivělosti.

Indukční období: období nejméně jednoho týdne po indukční expozici, během něhož se může rozvinout stav přecitlivělosti.

Provokační expozice: experimentální expozice subjektu dříve vystaveného zkoušené látce po indukčním období s cílem stanovit, zda je reakce subjektu přecitlivělá.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Citlivost a spolehlivost použité zkušební metody by měla být posouzena každých šest měsíců za použití látek, o kterých je známo, že mají mírné až středně silné senzibilizační účinky na kůži.

U správně provedené zkoušky vyvolávají mírné/střední senzibilizátory zpravidla nejméně 30 % reakci při metodě s adjuvanty a nejméně 15 % reakci při metodě bez adjuvantů.

Přednostně jsou používány tyto látky:

Čísla CAS	Čísla EINECS	Názvy podle EINECS	Obecné názvy
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyd	α-hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	2sulfanylbenzothiazol	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Za určitých okolností mohou být při dostatečném zdůvodnění použity jiné kontrolní látky splňující výše uvedená kritéria.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pokusným zvířatům je nejdříve aplikována zkoušená látka intradermálními injekcemi a/nebo epidermální aplikací (indukční expozice). Po období klidu 10 až 14 dnů (indukční období), v průběhu kterého se může rozvinout imunitní reakce, je zvířatům aplikována provokační dávka. Rozsah a stupeň kožní reakce pokusných zvířat na provokační expozici je porovnáván s rozsahem a stupněm reakce u kontrolních zvířat, která podstoupí negativní expozici v průběhu indukce a je jim aplikována provokační dávka.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍCH METOD

Pokud je považováno za nezbytné odstranit zkoušenou látku, použije se voda nebo vhodné rozpouštědlo, aniž by se změnila stávající reakce nebo integrita pokožky.

▼B

1.5.1 *Maximalizační zkouška na morčatech (GPMT)*

1.5.1.1 P ř í p r a v a

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.

1.5.1.2 Z k u š e b n í p o d m í n k y

1.5.1.2.1 Pokusná zvířata:

Použijí se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.

1.5.1.2.2 Počet a pohlaví

Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Experimentální skupina se skládá nejméně z 10 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 5 zvířat. Použije-li se méně než 20 experimentálních a 10 kontrolních morčat a není možné dojít k závěru, že je zkoušená látka senzibilizující, doporučuje se zkoušení na dalších zvířatech, aby byl celkový počet nejméně 20 experimentálních a 10 kontrolních zvířat.

1.5.1.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být taková, aby ji zvířata systémově dobře snášela, a měla by být nejvyšší koncentrací vyvolávající mírné až střední podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší dávce, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžnou studií na dvou nebo třech zvířatech. Pro tento účel by mělo být zváženo použití zvířat, kterým bylo podáno Freundovo kompletní adjuvans (FCA).

1.5.1.3 P o s t u p

1.5.1.3.1 Indukce

Den 0 – experimentální skupina

Tři dvojice intradermálních injekcí o objemu 0,1 ml se podají symetricky podle střední linie do lopatkové oblasti zbavené srsti.

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smísené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Injekce 2: zkoušená látka ve vhodném vehikulu ve zvolené koncentraci.

Injekce 3: zkoušená látka ve zvolené koncentraci připravené ve směsi s FCA a vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Pro injekci 3 se látky rozpustné ve vodě rozpustí před smísením s FCA ve vodné fázi. Látky rozpustné v lipidech nebo nerozpustné látky se před smísením s vodnou fází suspendují v FCA. Konečná koncentrace zkoušené látky musí být stejná jako koncentrace použitá v injekci 2.

▼B

Injekce 1 a 2 se aplikují blízko sebe a co nejblíže hlavě, zatímco injekce 3 se podává směrem ke kaudální části zkušební plochy.

Den 0 – kontrolní skupina

Tři dvojice subkutánních injekcí o objemu 0,1 ml se podají na stejná místa jako u experimentálních zvířat.

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smísené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Injekce 2: neředěné vehikulum.

Injekce 3: 50 % (m/V) směs vehikula se směsí FCA a vody nebo fyziologickém roztoku v poměru 1: 1 obj.

5.–7. den – experimentální a kontrolní skupiny

Přibližně dvacet čtyři hodin před povrchovou indukční aplikací, jestliže látka není dráždivá pro kůži, se po důkladném ostříhání a/nebo oholení nanese na zkušební plochu 0,5 ml 10 % natriumdodecylsulfátu ve vazelíně za účelem vyvolání místního podráždění.

6.–8. den – experimentální skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Filtrační papír (2 × 4 cm) se plně napustí zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu, přiloží se na zkušební plochu a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 48 hodin. Výběr vehikula by měl být zdůvodněn. Pevné látky se jemně rozetřou a vpraví do vhodného vehikula. Kapaliny lze aplikovat přímo, je-li to vhodné.

6.–8. den – kontrolní skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Na zkušební plochu se podobným způsobem nanese samotné vehikulum a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku po dobu 48 hodin.

1.5.1.3.2 Provokace

20.–22. den – experimentální a kontrolní skupiny

Boky pokusných i kontrolních zvířat se zbaví srsti. Na jeden bok zvířete se aplikuje zkoušená látka v plátku nebo v komůrce a na druhý bok se může popřípadě umístit plátek nebo komůrka obsahující pouze vehikulum. Plátky se fixují ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 24 hodin.

Pozorování a hodnocení: experimentální a kontrolní skupiny

— Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha očistí, důkladně ostříhá a/nebo oholí a v případě potřeby depiluje,

— přibližně po 3 hodinách (přibližně 48 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se pozoruje kožní reakce a zaznamená se podle stupnice uvedené v dodatku,

— přibližně 24 hodin po tomto pozorování se provede druhé pozorování (72 hodin) a opět se zaznamená reakce kůže.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvážena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých nálezů, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

1.5.2 *Bühlerova zkouška*

1.5.2.1 P ř í p r a v a

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.

1.5.2.2 Z k u š e b n í p o d m í n k y

1.5.2.2.1 Pokusná zvířata

Používají se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.

1.5.2.2.2 Počet a pohlaví

Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Experimentální skupina se skládá nejméně z 20 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 10 zvířat.

1.5.2.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být tou nejvyšší koncentrací, která vyvolá mírné, ne však silné podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší koncentraci, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžným pokusem na dvou nebo třech zvířatech.

Pro zkoušené látky rozpustné ve vodě je vhodné používat jako vehikulum vodu nebo nedráždivé zředěné roztoky povrchově aktivní látky. Pro ostatní zkoušené látky se upřednostňuje roztok 80 % alkoholu ve vodě pro indukci a aceton pro provokaci.

1.5.2.3 P o s t u p

1.5.2.3.1 Indukce

Den 0 – experimentální skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Zkušební plátek by měl být důkladně napuštěn zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu (výběr vehikula musí být zdůvodněn; tekuté zkoušené látky mohou být podle potřeby aplikovány neředěné).

Zkušební plátek se přiloží na zkušební plochu a po dobu 6 hodin se udržuje ve styku s kůží okluzivním plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem.

▼B

Systém s plátkem musí být okluzivní. Vhodný je bavlněný polštářek, může být kruhový nebo čtvercový, ale měl by mít velikost přibližně 4–6 cm^2. Pro zajištění okluze je vhodné použít vhodnou fixaci. Jsou-li použity obvazy, mohou být nezbytné dodatečné expozice.

Den 0 – kontrolní skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Na zkušební plochu se nanese vehikulum podobným způsobem jako u experimentální skupiny. Zkušební plátek se po dobu 6 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku nebo komůrky a vhodného obvazu. Pokud je možné prokázat, že kontrolní skupina podrobená negativní expozici není nezbytná, lze použít neexponovanou kontrolní skupinu.

6.–8. a 13.–15. den – experimentální a kontrolní skupina

Provede se stejná aplikace jako v den 0 na stejnou zkušební plochu (v případě potřeby zbavenou srsti) na tentýž bok, a to 6.–8. den a opět 13.–15. den.

1.5.2.3.2 Provokace

27.–29. den – experimentální a kontrolní skupina

Neošetřený bok pokusných a kontrolních zvířat se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Okluzivní plátek nebo komůrka obsahující příslušné množství zkoušené látky v nejvyšší nedráždivé koncentraci se aplikuje na zadní část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat.

Na přední část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat se popřípadě aplikuje okluzivní plátek nebo komůrka jen s vehikulem. Plátky nebo komůrky se po dobu 6 hodin fixují ve styku s kůží pomocí vhodného obvazu.

1.5.2.3.3 Pozorování a hodnocení

— Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha zbaví srsti,

— přibližně po třech hodinách (přibližně 30 hodin po aplikaci provokačního plátku) se pozorují kožní reakce a zaznamenají se podle stupnice uvedené v dodatku,

— přibližně 24 hodin po 30hodinovém pozorování (přibližně 54 hodin po aplikaci provokačního plátku) se opět pozorují kožní reakce a zaznamenají se.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvážena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých nálezů, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

2. **ÚDAJE (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé zvíře uvedou kožní reakce při každém pozorování.

3. **ZPRÁVY (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Pokud byla před zkouškou na morčatech provedena screeningová zkouška (např. zkouška ztluštění ucha u myší (MEST)), musí být s výsledky získanými se zkoušenými a referenčními látkami uveden popis této zkoušky nebo odkaz na tuto zkoušku, včetně podrobných informací o postupu.

Protokol o zkoušce (GMPT a Bühlerova zkouška)

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

Pokusná zvířata:

— použitý kmen morčat,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast,

— podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,

— výsledek předběžné studie a závěr týkající se indukčních a provokačních koncentrací, které byly při zkoušce použity,

— podrobné údaje o přípravě, aplikaci a odstranění zkoušené látky,

— zdůvodnění volby vehikula,

— koncentrace vehikula a zkoušené látky použité pro indukční a provokační expozice a celkové množství látky použité pro indukci a provokaci.

Výsledky:

— souhrn výsledků poslední kontroly citlivosti a spolehlivosti (viz 1.3), včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,

▼B

— posuzování jednotlivých zvířat, včetně systému klasifikace,

— podrobný popis charakteru a stupně pozorovaných účinků,

— všechny histopatologické nálezy.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 406.

▼B

Dodatek

TABULKA

Stupnice Magnussona/Kligmana pro hodnocení kožních reakcí na provokační expozici

0 = žádná viditelná změna

1 = slabé nebo skvrnité zarudnutí kůže

2 = mírné a splývající zarudnutí kůže

3 = intenzivní zarudnutí a zduření kůže

▼M4

B.7 **STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY U HLODAVCŮ – 28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 407 (2008). Původní Pokyny pro provádění testů 407 byly schváleny v roce 1981. V roce 1995 byla schválena revidovaná verze obsahující pokyny k získání dalších informací o zvířeti používaném ve studii, zejména o neurotoxicitě a imunotoxicitě.

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost s vysokou prioritou, a sice revizi stávajících Pokynů pro provádění testů a vývoj nových Pokynů pro zkoušení určených ke screeningu a zkouškám potenciálních endokrinních disruptorů (8). Součástí této činnosti byla aktualizace stávajících pokynů OECD pro „studii orální toxicity u hlodavců – 28denní opakovaná aplikace“ (TG 407) doplněním parametrů vhodných k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Tento postup prošel rozsáhlým mezinárodním programem, při němž se zkoušela relevance a praktičnost těchto doplňujících parametrů, funkčnost těchto parametrů u chemických látek s (anti)estrogenním, (anti)androgenním a (anti)tyreoidálním působením, vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a interference nových parametrů s parametry požadovanými předchozími pokyny TG 407. Získá se velké množství údajů, které jsou shrnuty a podrobně vyhodnoceny v souhrnné zprávě OECD (9). Tato aktualizovaná zkušební metoda B.7 (odpovídající TG 407) je výsledkem zkušeností a výsledků shromážděných v rámci mezinárodního zkušebního programu. Tato zkušební metoda umožňuje zkoumat souvislosti mezi určitými endokrinními účinky a jinými toxikologickými účinky.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity pomocí opakované aplikace dávek stanovit orální toxicitu. Tato zkušební metoda je určena ke zkoumání účinků toxicity u velmi širokého spektra potenciálních cílových míst. Poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, které mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici v relativně omezeném časovém období, včetně účinků na nervový, imunitní a endokrinní systém. S ohledem na tyto konkrétní cílové parametry by tato metoda měla identifikovat chemické látky s neurotoxickým potenciálem, které mohou vyžadovat jeho další důkladné prozkoumání, a chemické látky působící na štítnou žlázu. Rovněž může poskytnout údaje o chemických látkách, které působí na samčí a/nebo samičí pohlavní orgány u mladých dospělých zvířat, a mohou se pomocí ní zjistit imunologické účinky látek.

4. Výsledky této zkušební metody B.7 by se měly použít k identifikaci nebezpečnosti a posouzení rizik. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (11). Tato metoda se skládá ze základní studie toxicity po opakovaných dávkách, kterou lze použít u chemických látek, u nichž není důvod pro 90denní studii (např. když objem výroby nepřekračuje určité limity) nebo jako předběžnou studii k dlouhodobé studii. Expozice by měla trvat 28 dní.

▼M4

5. Mezinárodní program validace parametrů vhodných k potenciální detekci endokrinního působení zkoušené chemické látky ukázal, že kvalita údajů získaných touto zkušební metodou B.7 bude velmi záviset na zkušenostech laboratoře provádějící zkoušku. Týká se to konkrétně histopatologického určení cyklických změn v samičích pohlavních orgánech a stanovení hmotnosti malých orgánů závislých na hormonech, které se obtížně pitvají. Byly vyvinuty pokyny k histopatologickému vyšetření (19). K dispozici jsou na veřejných webových stránkách OECD věnovaných pokynům pro zkoušení (Test Guidelines). Mají za cíl pomoci patologům při vyšetřování a pomoci zvýšit citlivost rozborů. Byla nalezena řada různých parametrů svědčících o toxicitě pro endokrinní systém a tyto parametry byly začleněny do zkušební metody. Parametry, u nichž nebyl k dispozici dostatek údajů k ověření jejich použitelnosti nebo které vykazovaly pouze slabou průkaznost ve validačním programu hodnotícím jejich schopnost pomoci detekovat endokrinní disruptory, jsou navrženy jako volitelné cílové parametry (viz dodatek 2).

6. Na základě údajů získaných ve validačním postupu je nutné zdůraznit, že citlivost tohoto stanovení není dostatečná pro identifikaci všech látek s (anti)androgenními nebo (anti)estrogenními účinky (9). Tato zkušební metoda se neprovádí ve fázi života, v které je endokrinní systém nejcitlivější na poškození. Nicméně během validačního postupu tato metoda identifikovala látky, které slabě nebo silně ovlivňují funkci štítné žlázy a látky, které vykazují silný nebo středně silný endokrinní účinek prostřednictvím estrogenových nebo adrogenových receptorů, ve většině případů však byla neúspěšná při identifikaci endokrinně působících látek, které účinkují slabě na estrogenové nebo androgenové receptory. Nelze ji tudíž označit za screeningové stanovení endokrinního působení.

7. Nepřítomnost účinků souvisejících s těmito mechanismy působení proto nelze pokládat za důkaz nepřítomnosti účinků na endokrinní systém. Co se týká účinků zprostředkovaných endokrinní cestou, neměla by se tedy charakterizace látky zakládat pouze na výsledcích této zkušební metody, nýbrž by se měly tyto výsledky použít v rámci přístupu zvažování závažnosti důkazů, který používá všechny stávající údaje o chemické látce k charakterizaci jejího potenciálního endokrinního působení. Z tohoto důvodu by mělo regulační rozhodování o endokrinním působení (charakterizaci látky) vycházet z široké škály údajů, a nemělo by se opírat pouze o výsledky získané touto zkušební metodou.

8. Uznává se, že veškeré postupy používající zvířata musí splňovat místní normy péče o zvířata. Popisy péče a zacházení uvedené níže jsou minimálními standardy a budou nahrazeny místními předpisy, pokud ty jsou přísnější. Další pokyny o humánním zacházení se zvířaty poskytuje OECD (14).

9. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Zkoušená chemická látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky po dobu 28 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se utratí zvířata, která přežila, a rovněž se pitvají. 28denní studie poskytuje informace o účincích opakované orální expozice a může se ukázat, že jsou třeba další dlouhodobé studie. Také může poskytnout

▼M4

informace o výběru koncentrací pro dlouhodobé studie. Údaje získané použitím této zkušební metody by měly umožnit charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky, určení vztahu mezi dávkou a odezvou a stanovení hladiny bez pozorovaného nepříznivého účinku ((NOAEL).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

11. Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců. Jestliže se parametry uvedené v této zkušební metodě B.7 zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. Přestože je biologicky možné, že jiné druhy budou reagovat na toxické látky podobným způsobem jako potkan, použití menších druhů může vést ke zvýšené variabilitě v důsledku technické obtížnosti pitvy menších orgánů. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů byl jediným použitým druhem potkan. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro každé pohlaví. Provádí-li se studie opakovaného orálního podávání látky jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by se v obou studiích použít nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

12. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby čištění místnosti. Cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezenou dodávkou pitné vody. Výběr krmiva může být ovlivněn potřebou zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka tímto způsobem. Zvířata by měla být chována v malých skupinkách stejného pohlaví. Je-li to vědecky odůvodněné, mohou být zvířata umístěna jednotlivě. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat.

13. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

14. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

15. Zkoušená chemická látka se podává žaludeční sondou nebo v krmivu či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálních/chemických/toxikokinetických vlastnostech zkoušeného materiálu.

▼M4

16. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Kdykoli je to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití olejového roztoku/emulze (např. kukuřičného oleje) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měla by se stanovit stabilita zkoušené chemické látky v daném nosiči.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

17. Pro každou úroveň dávky by se mělo použít nejméně deset zvířat (pět samic a pět samců). Pokud se budou zvířata utrácet v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou utracena před ukončením studie. Mělo by se zvážit přidání další satelitní skupiny deseti zvířat (pět zvířat od každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po dobu nejméně 14 dní po ukončení aplikace mohla sledovat vratnost, přetrvávání nebo opožděný nástup toxických účinků.

Dávkování

18. Obecně by se měly použít nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina, ale pokud se na základě vyhodnocení jiných údajů neočekávají žádné účinky při dávce 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může se provést limitní zkouška. Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může se provést předběžná studie (na zvířatech stejného kmene a původu) pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky nosič, podává se kontrolní skupině nosič v nejvyšším použitém objemu.

19. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné chemické látky dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Poté by se měla zvolit sestupná řada úrovní dávek, aby se prokázaly účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Pro nastavení sestupných úrovní dávek bývá optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a často je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. koeficientu většímu než 10).

20. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na imunitní, neurologické nebo endokrinní citlivé cílové parametry interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

21. Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v krmivu nebo v pitné vodě v odpovídající koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o chemických látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří úrovní dávek nutná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

▼M4

Podávání dávek

22. Zkoušená chemická látka se zvířatům podává denně 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých chemických látek, u kterých se ve vyšších koncentracích stupňují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

23. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud se studie s opakovaným podáváním provádí jako předběžná studie k dlouhodobé studii, měla by se v obou studiích použít stejná krmivo.

Pozorování

24. Doba pozorování by měla být 28 dnů. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po dalších nejméně 14 dnů bez aplikace, aby se zachytil opožděný nástup, přetrvávání nebo zotavení se z toxických účinků.

25. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Měl by se zaznamenat zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

26. Před expozicí látce a dále nejméně jednou týdně by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby rozdíly ve zkušebních podmínkách byly co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nevědí, jakým testem zvířata procházejí. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (2).

27. Ve čtvrtém týdnu expozice látce by se měly vyšetřit reakce na různé smyslové podněty (2) (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), (3), (4), (5), síla úchopu (6) a motorická aktivita (7). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít také alternativní postupy.

▼M4

28. Pozorování funkčních poruch ve čtvrtém týdnu expozice látce lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) studii. V takovém případě by se mělo pozorování funkčních poruch zahrnout do této dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách ze studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou studii.

29. Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

30. Při pitvě lze určit estrální cyklus všech samic (volitelné) odebráním vaginálních stěrů. Tato pozorování poskytnou informace ohledně fáze estrálního cyklu v čase utracení zvířete a pomohou při histologickém vyšetření tkání citlivých na estrogen [viz pokyny k histopatologickému vyšetření (19)].

Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva/vody

31. Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Měření spotřeby krmiva by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit také spotřeba vody.

Hematologická vyšetření

32. Na konci zkoušky by se měla provést tato hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, retikulocytů, celkového počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a trombocytů a stanoví se protrombinový čas. Jestliže zkoušená chemická látka nebo její domnělé metabolity mají oxidační vlastnosti nebo existuje podezření, že je mají, měly by se stanovit také koncentrace methemoglobinu a Heinzových tělísek.

33. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek. Zvířata by se měla před utracením ponechat přes noc nalačno ([1]).

Biochemické vyšetření

34. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména účinků na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům těsně před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo utracených před dokončením studie). Vyšetření plazmy a séra obsahuje stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako je alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gama-glutamyltranspeptidáza a glutamátdehydrogenáza) a žlučových kyselin. Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a bilirubinu může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

35. Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukóza a krev/krvinky.

([1]) Pro řadu vyšetření séra a plazmy, zejména na glukózu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně může mít hladovění přes noc vliv na celkový metabolismus zvířat a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Pokud se krev odebírá nalačno, měla by se klinická biochemická vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu studie.

▼M4

36. Dále by se mělo zvážit vyšetření sérových markerů celkového poškození tkání. Další vyšetření by se mělo provést, jestliže známé vlastnosti zkoušené chemické látky mohou (nebo existuje podezření, že mohou) ovlivnit související metabolické profily, včetně vápníku, fosfátů, triglyceridů, specifických hormonů a cholinesterázy. Tyto profily je třeba identifikovat pro chemické látky patřící do určitých tříd nebo případ od případu.

37. Přestože v mezinárodním hodnocení cílových parametrů týkajících se endokrinního působení nebylo možno prokázat jasnou výhodu stanovení tyreoidních hormonů (T3, T4) a TSH, může být užitečné uchovat vzorky plazmy či séra k změření T3, T4 a TSH (volitelné), existuje-li náznak působení na osu hypofýza–štítná žláza. Tyto vzorky je možno uchovat zmrazené na – 20 °C. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

Definitivní identifikace chemických látek působících na štítnou žlázu je spolehlivější, pokud se provede pomocí histopatologické analýzy spíše než stanovením hladin hormonů.

38. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Doporučuje se, aby se zvážilo stanovení T3, T4 a TSH při nálezu histopatologických změn štítné žlázy. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší. V důsledku toho nemusí být možné poskytnout kritéria účinnosti vycházející z jednotných historických údajů. Laboratoře by se měly snažit udržovat kontrolní koeficienty odchylky pod hodnotou 25 pro T3 a T4 a pod hodnotou 35 pro TSH. Všechny koncentrace je nutno uvádět v jednotkách ng/ml.

39. Pokud nejsou údaje o výchozích hodnotách z dřívějších pozorování dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem podávání dávky nebo přednostně u skupiny zvířat nezahrnutých do experimentálních skupin.

PATOLOGIE

Makroskopická pitva

40. U všech zvířat zařazených do studie se provede celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, prostata + semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených před ukončením studie) by měly být zbaveny všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Při ořezávání přirostlých tkání z komplexu prostaty je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo propíchnutí semenných váčků naplněných tekutinou. Nebo je možné semenné váčky a prostatu odříznout a zvážit po fixaci.

▼**M4**

41. Kromě toho lze volitelně zvážit hned po sekci další dvě tkáně, aby se zabránilo jejich vyschnutí, a to párové vaječníky (vlhká hmotnost) a dělohu, včetně děložního hrdla (pokyny k odběru a přípravě děložních tkání k měření hmotnosti jsou uvedeny v OECD TG 440 (18)).

42. Hmotnost štítné žlázy (volitelné) lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu.

43. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu pro daný typ tkáně a zamýšlené následné histopatologické vyšetření (viz odstavec 47): všechny makroskopicky viditelné léze, mozek (reprezentativní oblasti zahrnující hemisféry, mozeček a most), mícha, oko, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, štítná žláza, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), gonády (varlata a vaječníky), přídatné pohlavní orgány (děloha a hrdlo děložní, nadvarlata, prostata + semenné váčky s Cowperovými žlázami), vagina, močový měchýř, lymfatické uzliny (kromě nejproximálnější svodné uzliny by se měla odebrat ještě jedna uzlina dle laboratorních zkušeností (15)), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*) přednostně v blízkosti svalu, kosterní sval a kost, s kostní dření (řez nebo čerstvý nátěr z aspirované kostní dřeně). Doporučuje se fixovat varlata ponořením do Bouinova nebo modifikovaného Davidsonova fixačního média (16), (17). *Tunica albuginea* se musí jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Konzervovat by se měly také všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány.

44. Následující tkáně mohou poskytnout cenné svědectví o endokrinních účincích: gonády (vaječníky a varlata), přídatné pohlavní orgány (děloha včetně děložního hrdla, nadvarlata, semenné váčky s Cowperovými žlázami, dorzolaterální a ventrální prostata), vagina, hypofýza, samčí prsní žláza, štítná žláza a nadledvinka. Změny na samčích prsních žlázách nebyly dostatečně zdokumentovány, avšak tento parametr může být velmi citlivý na látky s estrogenním působením. Pozorování orgánů/tkání, které nejsou uvedeny v odstavci 43, jsou volitelná (viz dodatek 2).

45. Pokyny k histopatologickému vyšetření (19) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

46. V mezinárodním zkušebním programu byly získány určité důkazy, že mírné endokrinní účinky chemických látek s nízkou účinností ovlivňující homeostázu pohlavních hormonů lze identifikovat podle poruch synchronizace estrálního cyklu v různých tkáních a v menší míře tolik na základě klinicky zřejmých histopatologických změn samičích pohlavních orgánů. Přestože pro tyto účinky nebyl získán definitivní důkaz, doporučuje se, aby se důkazy možné asynchronie estrálního cyklu vzaly v úvahu při interpretaci histopatologických nálezů na vaječnících (folikulární, thekální a granulózní buňky), děloze, hrdle děložním a vagině. Pokud se pomocí poševních stěrů vyhodnotí také fáze cyklu, může se do tohoto srovnání zařadit.

▼M4

Histopatologické vyšetření

47. U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny, které byla podána vysoká dávka, by se mělo provést celkové histopatologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by se mělo rozšířit i na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

48. Vyšetří se všechny makroskopické léze.

49. V případě použití satelitní skupiny by se mělo provést histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

50. Měly by se uvést údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí, jejich závažnost a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy léze.

51. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Srovnáním účinků v celém rozpětí dávkování by se mělo zamezit použití mnohonásobných t-testů. Statistické metody by se měly vybrat již při plánování studie.

52. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily dřívější kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

Protokol o zkoušce

53. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče, pokud je jiný než voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, krmivo atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva, o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

▼**M4**

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Volitelné zkoumané cílové parametry

— seznam volitelných zkoumaných cílových parametrů.

Výsledky:

— tělesná hmotnost a změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,

— hematologická vyšetření s příslušnými základními hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, jsou-li dostupné,

— popřípadě statistické zpracování výsledků.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICE

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T_3).

Dávkování je obecný termín zahrnující dávku, její četnost a trvání podávání látky.

Dávka je podávané množství zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiolu 17ß).

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T_3) v savčím organismu.

Validace je vědecký postup určený k charakterizaci provozních požadavků a omezení zkušební metody a k prokázání její spolehlivosti a relevantnosti pro konkrétní účel.

▼M4

Dodatek 2

Cílové parametry doporučené k detekci endokrinních disruptorů (ED) v této zkušební metodě B.7

Povinné cílové parametry	Volitelné cílové parametry
Hmotnost	
— varlata — nadvarlata — nadledvinky — prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami	— vaječníky — děloha včetně hrdla děložního — štítná žláza
Histopatologické vyšetření	
— gonády: — varlata a — vaječníky — přídatné pohlavní orgány: — nadvarlata — prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami — děloha včetně hrdla děložního — nadledvinky — štítná žláza — pochva	— poševní stěry — samčí prsní žlázy — hypofýza
Měření hormonů	
	— hladiny cirkulujícího T3 a T4 — hladina cirkulujícího TSH

LITERATURA:

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA: 28DENNÍ STUDIE

SHRNUTÍ

Tato revidovaná zkušební metoda B.8 byla navržena s cílem plně charakterizovat inhalační toxicitu zkoušené chemické látky po opakované expozici po omezené časové období (28 dnů) a získat údaje pro kvantitativní posouzení rizik inhalace. Skupiny alespoň 5 samců a 5 samic hlodavců se vystaví 6 hodin denně po dobu 28 dnů a) zkoušené chemické látce na třech nebo více úrovních koncentrace, b) filtrovanému vzduchu (negativní kontrola) a/nebo c) nosiči (kontrola s nosičem). Zvířata jsou obvykle exponována 5 dnů v týdnu, avšak expozice po 7 dnů v týdnu je rovněž povolena. Zkouška se vždy provádí se samci i samicemi, avšak jednotlivá pohlaví mohou být vystavena odlišným úrovním koncentrace, pokud je známo, že je jedno pohlaví citlivější vůči dané zkušební chemické látce. Tato metoda poskytuje vedoucímu studie možnost zařadit do zkoušky satelitní skupiny (k sledování vratnosti), bronchoalveolární laváž (BAL), neurologické testy a další klinická patologická a histopatologická vyšetření za účelem lepší charakterizace toxicity zkoušené chemické látky.

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení 412 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 412 (TG 412) pro subakutní inhalační toxicitu byly schváleny v roce 1981 (1). Tato zkušební metoda B.8 (odpovídající revidovaným pokynům TG 412) byla aktualizována tak, aby odrážela stav vědeckého poznání a naplňovala stávající a budoucí regulační potřeby.

2. Tato metoda umožňuje charakterizaci nepříznivých účinků po opakované denní inhalační expozici zkoušené chemické látce po dobu 28 dnů. Údaje získané z 28denních studií subakutní inhalační toxicity lze použít ke kvantitativnímu posouzení rizik (pokud se po ní neprovádí 90denní studie subchronické inhalační toxicity (Kapitola B.29 této přílohy)). Tyto údaje mohou rovněž poskytovat informace pro výběr koncentrací pro dlouhodobější studie, jako je 90denní studie subchronické inhalační toxicity. Tato zkušební metoda není speciálně určena pro zkoušky nanomateriálů. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech GD 39 (2).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby se zvýšila kvalita studie a minimalizovalo použití zvířat. Mezi informace, které usnadňují výběr vhodných zkušebních koncentrací, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli testů toxicity in vitro nebo in vivo, předpokládaná použití a možnost expozice lidí, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a údaje odvozené ze zkoušek akutní inhalační toxicity. Očekává-li se nebo je-li v průběhu studie pozorována neurotoxicita, může se vedoucí studie rozhodnout zařadit vhodná vyšetření, například funkční pozorovací baterii (functional observational battery, FOB) a měření motorické aktivity. Přestože načasování expozic s ohledem na konkrétní vyšetření může být velmi důležité, nemělo by provádění těchto doplňkových činností narušovat základní plán studie.

▼M4

4. Roztoky žíravých nebo dráždivých zkoušených chemických látek lze testovat při koncentracích, které povedou k požadovanému stupni toxicity [viz GD 39 (2)]. Při vystavování zvířat těmto materiálům by však měly být cílové koncentrace dostatečně nízké, aby nezpůsobily výraznou bolest a utrpení, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit individuálně případ od případu, nejlépe na základě výsledků vhodně navržené studie ke stanovení dávkování, která poskytuje informace o kritickém cílovém parametru, prahu dráždivosti a době nástupu účinků (viz odstavce 11–13). Mělo by se uvést zdůvodnění výběru dané koncentrace.

5. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo vykazují známky závažného a přetrvávajícího stresu by se měla humánním způsobem utratit. Umírající zvířata se posuzují stejným způsobem jako zvířata, která při zkoušce uhynou. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů OECD o humánních cílových parametrech (3).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

6. Měli by se použít mladí zdraví dospělí hlodavci běžně používaných laboratorních kmenů. Nejvhodnějším druhem je potkan. Pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

7. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den randomizace by mělo jít o mladé dospělé jedince staré 7 až 9 týdnů. Tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví. Zvířata se náhodně vyberou, označí pro potřeby individuální identifikace a umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem zkoušky, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

Zvířecí chov

8. Zvířata by měla být individuálně označena, nejlépe pomocí subkutánních transpondérů, aby se usnadnila pozorování a zamezilo záměně. Teplota zkušební místnosti, v níž se uchovávají zvířata, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla udržovat optimálně v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na zkumavky omezující pohyb. Zkumavky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo respirační objem za minutu. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na zkumavky omezující pohyb nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

▼M4

Inhalační komory

9. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i expozici hlavy, nosu a tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

STUDIE TOXICITY

Mezní koncentrace

10. Na rozdíl od akutních studií nejsou v 28denních studiích subakutní inhalační toxicity žádné definované mezní koncentrace. Maximální zkoušená koncentrace by měla zohledňovat: 1) maximální dosažitelnou koncentraci, 2) úroveň expozice člověka v „nejhorším případě“, 3) potřebu udržet dostatečný přívod kyslíku a/nebo 4) dobré životní podmínky zvířat. Chybí-li mezní hodnoty založené na skutečných údajích, mohou se použít akutní limity z nařízení (ES) č. 1272/2008 (13) (tj. maximálně 5 mg/l pro aerosoly, 20 mg/l pro páry a 20 000 ppm pro plyny), viz GD 39 (2). Pokud je při zkouškách plynů nebo vysoce těkavých chemických látek (např. chladicí prostředky) potřeba tyto limity překročit, mělo by se uvést zdůvodnění. Z mezní koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu bez toho, aby byly zvířata vystavena nadměrnému stresu nebo aby byla ovlivněna délka jejich života.

Studie k stanovení rozsahu

11. Před zahájením hlavní studie může být nutné provést studii k stanovení rozsahu. Studie k stanovení rozsahu je komplexnější než orientační studie, protože není omezená na výběr koncentrace. Poznatky získané ve studii k stanovení rozsahu mohou vést k úspěšné hlavní studii. Studie k stanovení rozsahu může například poskytnout technické informace týkající se analytických metod, velikosti částic, odhalení toxických mechanismů, klinické patologie a histopatologických údajů a odhady koncentrací NOAEL a MTC v hlavní studii. Vedoucí studie se může rozhodnout použít studii ke stanovení rozsahu pro určení prahové hodnoty pro podráždění dýchacích cest (např. pomocí histopatologického vyšetření dýchacích cest, zkoušení plicních funkcí nebo bronchoalveolární laváže), horní hranice koncentrace, kterou zvířata snáší bez nadměrného stresu, a parametrů, které budou nejlépe charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky.

12. Studie ke stanovení rozsahu může obsahovat jednu nebo více úrovní koncentrace. Každé úrovni koncentrace by se měli vystavit maximálně tři samci a tři samice. Studie ke stanovení rozsahu by měla trvat minimálně 5 dní a obvykle ne déle než 14 dní. Ve zprávě o studii by se mělo uvést zdůvodnění výběru koncentrací pro hlavní studii. Cílem hlavní studie je ukázat vztah mezi koncentrací a odezvou založený na předpokládaném nejcitlivějším cílovém parametru. Nízká koncentrace by měla být v ideálním případě koncentrace, při níž nejsou pozorovány nepříznivé účinky, zatímco z vysoké koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu, aniž by se zvířatům způsobil nadměrný stres nebo se ovlivnila délka jejich života (3).

▼M4

13. Při výběru úrovní koncentrace pro studii k stanovení rozsahu by se měly zvážit veškeré dostupné informace, včetně vztahů mezi strukturou a aktivitou a údajů o podobných chemických látkách (viz odstavec 3). Studie ke stanovení rozsahu může potvrdit/vyvrátit cílové parametry, které se považují z mechanistického hlediska za nejvíce citlivé, např. inhibice cholinesterázy organickými fosfáty, tvorba methemoglobinu v důsledku erytrocytotoxických látek, hormony štítné žlázy (T_3, T_4) u tyreotoxických látek, bílkoviny, LDH nebo neutrofily v bronchoalveolární laváži u neškodných špatně rozpustných částic nebo aerosolů dráždících plíce.

Hlavní studie

14. Hlavní studie subakutní toxicity se obvykle skládá ze tří úrovní koncentrace a rovněž zahrnuje souběžné negativní kontroly (se vzduchem) a/nebo dle potřeby kontroly s nosičem (viz odstavec 17). Při výběru vhodných úrovní expozice je třeba použít veškeré dostupné údaje, včetně výsledků studií systémové toxicity, metabolismu a kinetiky (zvláštní důraz by se měl klást na vyloučení vysokých úrovní koncentrace, které saturují kinetické procesy). Každá experimentální skupina obsahuje alespoň 10 hlodavců (5 samců a 5 samic), kteří jsou vystaveni zkoušené chemické látce každý den 6 hodin 5 dnů v týdnu po dobu 4 týdnů (celková doba trvání studie je 28 dní). Zvířata lze rovněž vystavit látce 7 dní v týdnu (např. při zkouškách inhalačních farmaceutik). Je-li známo, že je jedno pohlaví vůči dané zkoušené chemické látce citlivější, je možné vystavit jednotlivá pohlaví odlišným úrovním koncentrace, aby se optimalizoval vztah mezi koncentrací a odezvou, jak popisuje odstavec 15. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Použije-li se doba expozice kratší než 6 hodin/den nebo pokud je třeba provést studii celotělové expozice s dlouhou dobou expozice (např. 22 hodin/den), mělo by se uvést zdůvodnění [viz GD 39 (2)]. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat, jestliže doba expozice nepřesahuje 6 hodin. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

15. Zvolené cílové koncentrace by měly vést k identifikaci cílového orgánu (cílových orgánů) a ukázat jasný vztah mezi koncentrací a odezvou:

— Vysoká úroveň koncentrace by měla mít toxické účinky, avšak neměla by způsobovat trvalé následky či letalitu, které by zabránily smysluplnému vyhodnocení.

— Střední úrovně koncentrací mezi mezními hodnotami by měly odstupňovány, aby se toxické účinky zvyšovaly od nízké po vysokou koncentraci.

— Nízká úroveň koncentrace by měla vyvolat malé nebo žádné příznaky toxicity.

Satelitní studie (k sledování vratnosti)

16. Satelitní studii (ke sledování vratnosti) je možné použít k pozorování vratnosti, přetrvávání nebo opožděného nástupu toxicity během dostatečně dlouhého období po expozici, nejméně však po 14 dnů. Skupiny v satelitní studii (ke sledování vratnosti) jsou složeny z pěti samců a pěti samic a jsou látce vystaveny současně s pokusnými zvířaty v hlavní studii. Skupiny v satelitní studii (ke sledování vratnosti) by se měly vystavit nejvyšší úrovni koncentrace zkoušené chemické látky a měly by se použít souběžné kontroly se vzduchem a/nebo s nosičem, dle potřeby (viz odstavec 17).

▼M4

Kontrolní zvířata

17. Se zvířaty v souběžné negativní (vzduch) kontrolní skupině by se mělo zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině až na to, že se namísto zkoušené chemické látce vystaví filtrovanému vzduchu. Pokud se ke generování zkušební atmosféry používá také voda nebo jiná látka, měla by se do studie namísto negativní kontroly se vzduchem zařadit kontrolní skupina s nosičem. Kdykoli je to možné, měla by se jako nosič použít voda. Použije-li se jako nosič voda, měla by se kontrolní zvířata vystavit vzduchu o stejné relativní vlhkosti jako experimentální skupiny. Výběr vhodného nosiče by se měl zakládat na vhodně provedené předběžné studii nebo na historických údajích. Není-li toxicita nosiče dobře známa, může se vedoucí studie rozhodnout použít jak negativní kontrolu (vzduch), tak kontrolu s nosičem, ale takový postup se rozhodně nedoporučuje. Jestliže historické údaje ukážou, že nosič není toxický, není třeba používat negativní (vzduch) kontrolní skupinu a měla by se použít pouze kontrolní skupina s nosičem. Jestliže předběžná studie zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a měla by se použít tato kontrola s nosičem.

PODMÍNKY EXPOZICE

Podávání koncentrací

18. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací. Materiál složený z částic je možno podrobit mechanickým postupům na snížení velikosti částic. Další pokyny jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

Distribuce velikosti částic

19. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení rozměrů částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 3 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (4). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba předložit odborný posudek. Například částice kovových výparů mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice a vlákna ji mohou překračovat.

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

20. V ideálním případě by se měla zkoušená chemická látka testovat bez nosiče. Jestliže je nutno použít nosič k získání vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky, měla by se přednostně použít voda. Kdykoli je zkoušená chemická látka v tomto nosiči rozpuštěna, měla by se prokázat její stabilita.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

21. Proudění vzduchu expoziční komorou by se mělo při každé expozici pečlivě kontrolovat, neustále monitorovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech. Monitorování koncentrace (nebo stability) látky ve zkušební atmosféře je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek ke kontrole všech důležitých dynamických inhalačních parametrů. Monitoruje-li se koncentrace v reálném čase, je

▼M4

možno snížit frekvenci měření průtoku vzduchu komorou na jediné měření pro každou expozici za den. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tomu, aby se zamezilo opětovnému vdechování látky v komorách s nazální cestou expozice. Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit. Jestliže měření v první den expozice ukážou, že jsou úrovně těchto plynů správné, není třeba další měření provádět.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

22. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v dýchací zóně zvířat, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla nepřetržitě sledovat a zaznamenávat pokud možno nejméně v hodinových intervalech během každé expozice. Relativní vlhkost by se měla udržovat nejlépe v rozmezí 30 až 70 %, to však může být neproveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo obtížně měřitelné v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

23. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím systémem inhalační komory. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

24. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky ve vzorcích odebraných v dýchací zóně zvířat v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu rozptýleného ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, je během studie nutné provádět v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze.

25. Během celé studie by se měla používat pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za takových podmínek, aby zůstal čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a je-li to technicky proveditelné, její identity a množství identifikovaných příměsí a nečistot. Prokázat to lze mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do určité míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. barvu, fyzikální vlastnosti atp.).

▼M4

26. Dle možností by se měla udržovat konstantní expoziční atmosféra. K prokázání stability podmínek expozice lze použít přístroj pro sledování v reálném čase, například fotometr pro aerosoly nebo analyzátor celkových uhlovodíků pro páry. Skutečné koncentrace v komoře by se měly měřit alespoň třikrát během každého dne expozice a pro každou úroveň expozice. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, je přípustné použít jeden vzorek pro každé období expozice. V ideálním případě by se měl tento vzorek odebírat po celou dobu expozice. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována. Bere se při tom v úvahu doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}) a doba rozpadu. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (2).

27. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře jinak. Proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo indikační látky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

28. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla stanovit alespoň jednou týdně pro každou úroveň koncentrace pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic (APS). Je-li možno prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru a jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie.

29. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možno v časné fázi studie prokázat u veškerých zkoušených koncentrací jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat studii.

30. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází.

POZOROVÁNÍ

31. Zvířata by se měla klinicky sledovat před expozicí, během expozice i po expozici. Mohou být nutná častější pozorování v závislosti na reakci zvířat během expozice. Je-li pozorování zvířat znemožněno použitím zkumavek omezujících pohyb zvířat, špatným osvětlením v komorách pro celotělovou expozici nebo neprůhlednou atmosférou, měla by se zvířata pečlivě pozorovat po expozici. Pozorování před následujícím dnem expozice mohou vést k vyhodnocení případné reverzibility nebo exacerbace toxických účinků.

▼M4

32. Všechna sledování se zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře zvlášť. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je třeba dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

33. Pozorování v kleci by se měla zaměřit na změny kůže, srsti, očí, sliznic, a rovněž na změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je třeba pozorně sledovat, zde se neobjeví tremor, křeče, slinění, průjmy, letargie, spánek a kóma. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci. Do protokolu studie je možno zahrnout doplňující vyšetření, například kinetiku, biomonitoring, plicní funkce, zadržování špatně rozpustných materiálů, které se hromadí v plicní tkáni a změny v chování.

TĚLESNÉ HMOTNOSTI

34. Tělesná hmotnost jednotlivých zvířat by se měla zaznamenat krátce před první expozicí (den 0), poté dvakrát týdně (například každý pátek a pondělí, aby se prokázalo zotavení po víkendu bez expozice, nebo v takovém časovém intervalu, který umožňuje posouzení systémové toxicity) a v čase uhynutí nebo utracení. Pokud se během prvních 2 týdnů neobjeví žádné účinky na tělesnou hmotnost, lze ji po zbytek studie měřit pouze jednou týdně. Zvířata v satelitní skupině (sledování reverzibility) (jsou-li použita) by se měla nadále vážit jednou týdně po celé období zotavování. Na konci studie by se měla všechna zvířata krátce před utracením zvážit, aby bylo možno provést nezkreslený výpočet podílů hmotnosti orgánů vůči tělesné hmotnosti.

SPOTŘEBA KRMIVA A VODY

35. Spotřeba krmiva by se měla měřit jednou týdně. Rovněž by se měla měřit spotřeba vody.

KLINICKÁ PATOLOGIE

36. Klinická patologická vyšetření by se měla provést u všech zvířat, včetně zvířat v kontrolní a satelitní (sledování reverzibility) skupině, když jsou utracena. Měl by se zaznamenat časový interval mezi koncem expozice a odběrem krve, zejména pokud je obnova příslušného cílového parametru rychlá. Odběr vzorků po ukončení expozice je indikován pro parametry s krátkým eliminačním poločasem v plazmě (např. COHb, CHE a MetHb).

37. Tabulka 1 uvádí klinické patologické parametry, které jsou obvykle vyžadovány ve všech toxikologických studiích. Analýza moči se běžně nevyžaduje, může se však provést, pokud se to považuje za vhodné na základě očekávané nebo pozorované toxicity. Vedoucí studie se může rozhodnout vyšetřit další parametry k lepší charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky (např. cholinesteráza, lipidy, hormony, acidobazická rovnováha, methemoglobin nebo Heinzova tělíska, kreatinkináza, poměr myeloidní/erythroidní buňky, troponiny, vyšetření krevních plynů, laktátdehydrogenáza, sorbitoldehydrogenáza, glutamátdehydrogenáza a gamaglutamyltranspeptidáza).

▼M4

Tabulka 1

Standardní klinické patologické parametry

Hematologická vyšetření	
počet erytrocytů	celkový počet leukocytů
hematokrit	diferenciální rozpočet leukocytů
koncentrace hemoglobinu	počet trombocytů
průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu	srážlivost (vyberte jednu z možností):
střední objem erytrocytu	— protrombinový čas
průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu	— koagulační čas
retikulocyty	— parciální tromboplastinový čas

Klinická biochemická vyšetření	
glukóza (*)	alaninaminotransferáza
celkový cholesterol	aspartátaminotransferáza
triglyceridy	alkalická fosfatáza
močovinový dusík v krvi	draslík
celkový bilirubin	sodík
kreatinin	vápník
celkový obsah proteinů	fosfor
albuminy	chloridy
globuliny	

Rozbor moči (volitelný)	
vzhled (barva a zákal)	celkový obsah proteinů
objem	glukóza
relativní hustota nebo osmolalita	krev/krvinky
pH	

(*) Dlouhé období lačnění může zkreslit výsledky měření glukózy u exponovaných zvířat oproti zvířatům kontrolním. Vedoucí studie by proto měl určit, zda je vhodné, aby zvířata lačnila. Používá-li se období lačnění, mělo by být vhodné pro daný použitý druh. U potkana to může být 16 h (lačnění přes noc). Stanovení glukózy nalačno lze provést po lačnění přes noc během posledního týdne expozice nebo po lačnění přes noc před pitvou (v tomto případě se provede společně se všemi ostatními klinickými patologickými parametry).

38. Existují-li důkazy o tom, že hlavním místem depozice a retence jsou dolní cesty dýchací (tj. alveoly), jako technika pro kvantitativní analýzu hypotetických parametrů závislosti účinku na dávce zaměřená na alveolitidu, plicní zánět a fosfolipidózu, může být zvolena bronchoalveolární laváž (BAL). Umožňuje vhodně vyšetřit změny ve vztazích dávka–odezva a čas–průběh při poškození plicních sklípků. V tekutině z BAL lze stanovit diferenciální rozpočet leukocytů, celkový obsah proteinů a laktátdehydrogenázu. Další parametry, jejichž analýzu je možno zvážit, jsou ty, které svědčí o lysozomálním poškození, fosfolipidóze, fibróze, zánětu z podráždění nebo alergickém zánětu, což může zahrnovat stanovení prozánětlivých cytokinů/chemokinů. Měření v tekutině BAL obecně doplňují výsledky histopatologických vyšetření, avšak nemohou je nahradit. Pokyny, jak provádět laváž plic, jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

▼M4

PITVA A HMOTNOSTI ORGÁNŮ

39. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu ohleduplného zacházení se zvířaty, by se měla podrobit úplnému vykrvení (je-li proveditelné) a pitvě. Měla by se zaznamenat doba mezi koncem poslední expozice zvířete a jeho utracením. Není-li možno pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotě dostatečně nízké k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

40. Tabulka 2 uvádí orgány a tkáně, které by se měly během pitvy konzervovat ve vhodném médiu pro histopatologické vyšetření. Uchovávání orgánů a tkání [uvedených v závorkách] a jakýchkoli dalších orgánů a tkání závisí na rozhodnutí vedoucího studie. Orgány uvedené **tučným** písmem by se měly co nejdříve po vyjmutí z těla zbavit přirostlých tkání a zvážit, než začnou vysychat. Štítná žláza a nadvarlata by se měly vážit pouze v případě potřeby, neboť artefakty z ořezávání přirostlých tkání mohou bránit histopatologickému vyšetření. Tkáně a orgány by se měly fixovat v 10 % pufrovaném formalínu nebo jiném vhodném fixativu ihned po provedení pitvy a ne později než 24–48 hodin před ořezáváním přirostlých tkání v závislosti na použitém fixativu.

Tabulka 2

Orgány a tkáně, které se během pitvy konzervují

Nadledvinky	Semenné váčky
Kostní dřeň (a/nebo čerstvý aspirát)	Mícha (krční, střední hrudní a bederní)
Mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	**Slezina**
	Žaludek
[Oči (sítnice, oční nerv) a oční víčka]	**Varlata**
Srdce	**Brzlík**
Ledviny	Štítná žláza
Hrtan (3 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat bázi *epiglottis*)	Průdušnice (alespoň dvě úrovně zahrnující 1 podélný řez skrz *carinu tracheae* a 1 příčný řez)
Játra	[Močový měchýř]
Plíce (všechny laloky v jedné úrovni včetně hlavních bronchů)	Děloha
Lymfatické uzliny z oblasti plicního hilu, zejména v případě špatně rozpustných partikulárních zkoušených chemických látek. Pro podrobnější vyšetření a/nebo studie s imunologickým zaměřením lze uvažovat i o dalších lymfatických uzlinách, např. z oblasti mediastina, oblasti cervikální, submandibulární a aurikulární.	Všechny makroskopicky viditelné léze
Nosohltanové tkáně (alespoň 4 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* a lymfatickou tkáň nosní sliznice (NALT))	
Jícen	
[*Bulbus olfactorius*]	
Vaječníky	

▼M4

41. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem při tlaku 20–30 cm vodního sloupce, aby se zachovala struktura plic (5). U všech laloků by se měly řezy odebrat na jedné úrovni, včetně hlavních bronchů, avšak provádí-li se plicní laváž, měly by se u nevyplachovaného laloku provést řezy na třech úrovních (nikoli sériové řezy).

42. Měly by se vyšetřit alespoň 4 úrovně tkání nosohltanu, z nichž jedna by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* (5, 6, 7, 8, 9), aby bylo možno dostatečně vyšetřit dlaždicový, přechodný (respirační bez řasinek), respirační (řasinkový respirační) a čichový epitel a svodnou lymfatickou tkáň (NALT; 10, 11). Měly by se vyšetřit tři úrovně hrtanu a jedna z těchto úrovní by měla zahrnovat bázi příklopky hrtanové (12). Měly by se vyšetřit alespoň dvě úrovně průdušnice, a to tak, že jeden podélný řez se povede skrz *carina tracheae* v místě bifurkace a jeden příčný řez.

HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

43. Mělo by se provést histopatologické vyšetření všech orgánů a tkání uvedených v tabulce 2 u kontrolní skupiny a skupiny vystavené vysoké koncentraci látky a u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během studie. Zvláštní pozornost je třeba věnovat dýchacím cestám, cílovým orgánům a makroskopicky viditelným lézím. Orgány a tkáně, u nichž se objeví léze u skupiny zvířat vystavené vysoké koncentraci látky, by se měly vyšetřit ve všech skupinách. Vedoucí studie se může rozhodnout provést histopatologická vyšetření v dalších skupinách, aby se prokázala jasná odezva na koncentraci. V případě použití satelitní skupiny (sledování reverzibility) by se mělo provést histopatologické vyšetření všech tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin. Pokud ve skupině s expozicí vysoké koncentraci látky příliš brzy uhyne velký počet zvířat nebo vzniknou jiné problémy, které by mohly zpochybnit významnost údajů, měla by se histopatologicky vyšetřit nejbližší nižší koncentrace. Měl by se učinit pokus porovnat makroskopicky viditelné změny s mikroskopickými nálezy.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

44. U každého zvířete by se měly uvést údaje o tělesné hmotnosti, spotřebě krmiva, klinické patologické údaje, údaje z pitvy, hmotnosti orgánů a histopatologické nálezy. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, čas uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy. Všechny výsledky, kvantitativní a incidentální, by se měly vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Lze použít všeobecně uznávanou statistickou metodu. Statistické metody by se měly zvolit během vypracovávání návrhu studie.

Protokol o zkoušce

45. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, délku světelné fáze a druh krmiva,

▼M4

— použitý druh/kmen a odůvodnění, pokud se použil jiný druh než potkan. Je možné uvést údaje ze zdroje a historické údaje, pokud se týkají zvířat, která byla exponována za podobných podmínek expozice, chovu a lačnění,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně krmiva, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a v případě potřeby fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a registrační číslo CAS (Chemical Abstract Services), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně objemu a nákresu,

— zdroj a popis zařízení použitého k expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení k měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizační systém,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (v případě nazální expozice), umístění zvířat v komoře (v případě celotělové expozice),

— stabilita zkušební atmosféry,

— umístění čidel ke snímání teploty a vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— úprava dodávaného/odsávaného vzduchu,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t95),

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

▼M4

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět raději v hmotnostních jednotkách (mg/l, mg/m^3, atd.) než v objemových jednotkách (ppm, ppb atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých ke snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno s nákresem) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o zařízení použitém k monitorování teploty a vlhkosti v komoře a proudění vzduchu komorou (tj. vývoj kalibrační křivky),

— podrobné údaje o zařízení použitém k odběru vzorků ke stanovení koncentrace látky v komoře a distribuce velikosti částic,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— metoda randomizace použitá k rozdělení zvířat do zkoušených a kontrolních skupin,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

▼M4

— tabulka s údaji o tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat,

— tabulka s údaji o spotřebě krmiva,

— tabulka s klinickými patologickými údaji,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— tabulka se všemi dalšími měřenými parametry.

Diskuse a interpretace výsledků

— zvláštní důraz by se měl klást na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možné splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých ke stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztahu mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo lokální),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutné humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (3),

— měl(y) by se určit cílový (cílové) orgán(y),

— měla by se stanovit hodnota NOAEL a LOAEL.

LITERATURA:

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼B

B.9 **DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 28 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během doby aplikace se zvířata denně pozorují s cílem zjistit příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je potřeba obvykle opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani, králíci nebo morčata. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno.

▼B

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Mimoto je možné exponovat po dobu 28 dnů satelitní skupinu 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) vysokou dávkou a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, je-li použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině. Použije-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se na kontrolní skupinu stejným způsobem a ve stejném množství, jako ve skupině, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li navíc k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, je-li známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se známky toxicity objeví a vymizí.

▼B

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata ve všech satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit. Jako alternativní metody je možno použít „ochranného límce“.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

1) hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve;

2) klinické biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátoxalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

▼B

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.4 **Pitva**

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny, plíce a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně, tj. normální a exponovaná kůže, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny, srdce a cílové orgány (orgány s lézemi nebo změnami velikosti), je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření.

1.6.5 **Histopatologické vyšetření**

U skupiny, které byla aplikována vysoká dávka, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze satelitní skupiny se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.),

— zkušební podmínky (včetně typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— dávka, při které nedochází k účinkům, pokud je to možné,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky,

— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do konce zkoušky,

— toxické a jiné účinky,

— doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,

— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,

— provedená hematologická vyšetření a výsledky,

▼B

— provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické zpracování výsledků, kde je to možné,

— diskuse a výsledky,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

▼B

B.10 **Mutagenita – zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro***

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 473 – Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* (1997).

1.1 ÚVOD

Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* má identifikovat činitele, které způsobují strukturní chromozomové aberace v kultivovaných buňkách savců (1, 2, 3). Rozlišují se dva typy strukturních aberací: chromozomové a chromatidové. U většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromozomové aberace se rovněž vyskytují. Nárůst polyploidie může znamenat, že chemická látka má schopnost indukovat numerické aberace. Tato metoda však není určena ke stanovení numerických aberací a není k tomuto účelu rutinně používána. Chromozomové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že chromozomové mutace a s nimi související jevy způsobující změny v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory, mají podíl na indukci rakoviny u člověka a u pokusných zvířat.

Ke zkoušce na chromozomové aberace *in vitro* mohou být použity stabilizované buněčné linie, buněčné kmeny nebo primární buněčné kultury. Použité buňky jsou vybrány na základě schopnosti růstu v kultuře, stálosti karyotypu, počtu chromozomů, rozmanitosti chromozomů a spontánní četnosti chromozomových aberací.

Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Tento metabolický aktivační systém nemůže zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Je třeba se zcela vyvarovat podmínek, které by vedly k pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu a může k nim dojít změnou pH, osmolality nebo vysokých úrovní cytotoxicity (4, 5).

Tato zkouška se používá ke zjištění možných mutagenů a karcinogenů pro savce. Mnoho sloučenin, které jsou v této zkoušce pozitivní, jsou pro savce karcinogenní, avšak mezi touto zkouškou a karcinogenitou však není absolutní korelace. Korelace závisí na chemické třídě a přibývají důkazy o tom, že existují karcinogeny, které nejsou zjištěny touto zkouškou, neboť zřejmě působí jinými mechanismy než přímým poškozením DNA.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

▼B

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozomy se 4, 8, 16 … chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimální odchylkou chromatid.

Mitotický index: podíl buněk, které se nacházejí v metafázi, z celkového počtu buněk v populaci; udává stupeň proliferace této populace.

Numerická aberace: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitého typu buněk.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (*n*) jiný než diploidní (tj. 3*n*, 4*n* atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozomální nebo interchromozomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Buněčné kultury jsou vystaveny zkoušené látce, a to s metabolickou aktivací a bez ní. V předem stanovených intervalech po zkoušené látce se do buněčných kultur přidá látka zastavující metafázi (např. Colcemid nebo kolchicin), kultury se sklidí, obarví a přítomnost chromozomových aberací se zjistí mikroskopickým pozorováním buněk.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava**

1.4.1.1 *Buňky*

Mohou být použity různé buněčné linie, kmeny nebo primární buněčné kultury, včetně lidských buněčných linií (např. fibroblasty křečka čínského, lymfocyty periferní krve člověka nebo jiných savců).

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro udržování kultur by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO_2 teplota a vlhkost). U stabilizovaných buněčných linií a kmenů by měla být rutinně kontrolována stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by být kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty; v případě kontaminace by neměly být použity. Pro použité buňky a inkubační podmínky by měla být známa normální délka buněčného cyklu.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Stabilizované buněčné linie a kmeny: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence před sklizením, a inkubují se při 37 °C.

▼B

Lymfocyty: krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty zdravých probandů se přidají do kultivačního média obsahujícího mitogen (např. fytohemaglutinin) a inkubují se při 37 °C.

1.4.1.4 *Metabolická aktivace*

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodnou metabolickou aktivací a bez ní. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (6, 7, 8 a 9), nebo směs fenobarbitonu a β-naftoflavonu (10, 11 a 12).

Postmitochondriální frakce je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích 1–10 % obj. Stav metabolického aktivačního systému může záviset na třídě chemické látky, která je zkoušena. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce.

Řada výsledků vývoje, včetně přípravy geneticky modifikovaných buněčných linií exprimujících specifické aktivační enzymy, poskytuje možnosti pro endogenní aktivaci. Volba použitých buněčných linií by měla být vědecky zdůvodněna (např. důležitostí isoenzymu cytochromu P450 pro metabolismus zkoušené látky).

1.4.1.5 *Zkoušená látka/příprava*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím buněk a s aktivitou S9. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu. Vodu lze odstranit přidáním molekulového síta.

1.4.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v testovacím systému a změny pH nebo osmolality.

Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez ní v hlavním experimentu za použití vhodných indikátorů buněčné integrity a růstu, jako jsou stupeň konfluence, počet životaschopných buněk nebo mitotický index. Může být výhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžném experimentu.

▼B

Měly by být použity alespoň tři analyzovatelné koncentrace. V případě cytotoxicity by měly tyto koncentrace pokrývat rozmezí dané maximální až minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou, což obvykle znamená, že by se koncentrace neměly lišit více nežli faktorem 2 až 10. V okamžiku sklizně by měla nejvyšší koncentrace vykazovat významné snížení stupně konfluence, počtu buněk nebo mitotického indexu (vše o více než 50 %). Mitotický index je pouze nepřímým měřítkem cytotoxických nebo cytostatických účinků a závisí na době, která uplynula od expozice. Mitotický index je však přijatelný u suspenzních kultur, u nichž mohou být jiné metody stanovení toxicity obtížné a nepraktické. Informace o kinetice buněčného cyklu, například průměrná generační doba (AGT), mohou být použity jako dodatkové informace. V případě AGT však jde o celkovou průměrnou hodnotu, z níž nelze usoudit na existenci zpožděných subpopulací, a i malý přírůstek průměrné generační doby může mít za následek velmi podstatné oddálení okamžiku optimálního výtěžku aberací.

V případě relativně necytotoxických látek by měla být maximální zkušební koncentrace 5 µl/ml, 5 mg/ml nebo 0,01 M, podle toho, která z nich je nejnižší.

V případě relativně nerozpustných látek, které nejsou toxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by měla být použita nejvyšší dávka v koncentraci, jež je nad mezí rozpustnosti v konečném kultivačním médiu na konci doby aplikace. V určitých případech (např. projeví-li se toxicita pouze při vyšších koncentracích, než je rozpustnost) se doporučuje vyzkoušet více koncentrací, při nichž dochází ke srážení. Může být užitečné stanovit rozpustnost na začátku a na konci expozice, neboť koncentrace v testovacím systému se může v průběhu expozice měnit v důsledku přítomnosti buněk, séra S9 atd. Nerozpustnost lze zjistit vizuálně. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

1.4.2.3 *Negativní a pozitivní kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní kontroly (kontroly rozpouštědla nebo vehikula). Při použití metabolické aktivace by měla být pro pozitivní kontrolu použita chemická látka, která k mutagenní reakci vyžaduje aktivaci.

K pozitivní kontrole by měl být použit známý elastogen v expozičních koncentracích, které nejspíše poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst nad pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému.

Koncentrace pozitivních kontrol by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Příklady pozitivních a negativních kontrol:

Stav metabolické aktivace	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Bez vnější metabolické aktivace	methyl-methansulfonát	66-27-3	200-625-0
	ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7

▼B

Stav metabolické aktivace	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
	1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1
S vnější metabolickou aktivací	benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid cyklofosfamid monohydrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Pro pozitivní kontrolu mohou být použity i jiné vhodné látky. Pro pozitivní kontrolu by mělo být pokud možno vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy.

V okamžiku sklizení by měly být použity negativní kontroly skládající se ze samotného rozpouštědla nebo vehikula v kultivačním médiu a zpracované stejným způsobem jako kultury. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.4.3 **Postup**

1.4.3.1 *Expozice zkoušené látce*

Proliferující buňky se vystaví zkoušené látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice lymfocytů by měla být zahájena asi 48 hodin po mitogenní stimulaci.

1.4.3.2 Pro každou koncentraci by měly být obvykle použity duplicitní kultury, a totéž se důrazně doporučuje u kultur pro negativní kontrolu nebo kontrolu rozpouštědla. Jestliže lze na základě dosavadních údajů prokázat (13, 14), že mezi duplicitními kulturami je minimální rozdíl, může být přípustné použití jediné kultury.

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (15, 16).

1.4.3.3 *Doba sklizně kultur*

V prvním experimentu by měly být buňky vystaveny zkoušené látce, jak s metabolickou aktivací, tak bez ní, na dobu 3–6 hodin, a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu (12). Jestliže tento postup dává negativní výsledky jak s aktivací, tak bez aktivace, měl by být proveden dodatečný experiment bez aktivace s nepřetržitou expozicí až do odběru v době, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu. Určité chemické látky lze snáze detekovat při dobách aplikace nebo odběru delších než 1,5násobek délky cyklu. Negativní výsledky při metabolické aktivaci musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění.

▼B

1.4.3.4 *Příprava preparátů pro analýzu chromozomů*

Do buněčné kultury se obvykle 1–3 hodiny před sklizením přidá Colcemid nebo kolchicin. Pro přípravu preparátů pro analýzu chromozomů se každá buněčná kultura sklízí a zpracovává zvlášť. Příprava preparátů pro analýzu chromozomů zahrnuje hypotonizaci buněk, fixaci a obarvení buněk.

1.4.3.5 *Analýza*

Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Poněvadž při fixaci často dochází ke zlomu části buněk v metafázi a ke ztrátě chromozomů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu rovném modální hodnotě ± 2 pro všechny typy buněk. Na každou koncentraci a kontrolu by mělo být hodnoceno alespoň 200 dobře rozprostřených metafází, případně rovnoměrně rozdělených mezi duplicitní kultury. Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací.

Ačkoli je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozomové aberace, je důležité zaznamenat polyploidii a endoreduplikace, jsou-li pozorovány.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Experimentální jednotkou je buňka a mělo by tedy být vyhodnoceno množství buněk se strukturní chromozomovou aberací (aberacemi) vyjádřené v procentech. Pro kontrolní a experimentální kultury by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahrnují se do celkové četnosti aberací.

Měla by být také zaznamenána opatření, která byla provedena pro stanovení cytotoxicity u všech exponovaných kultur a negativních kultur v hlavních experimentech s aberacemi.

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé kultury. Dále by měly být všechny údaje shrnuty ve formě tabulky.

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Nezbytnost potvrdit negativní výsledky byla diskutována v bodu 1.4.3.3. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací a podmínky metabolické aktivace.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst tohoto počtu. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (3, 13). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

▼B

Nárůst počtu polyploidie buněk může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozomové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (17, 18).

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky ze zkoušky na chromozomové aberace *in vitro* znamenají, že zkoušená látka indukuje v kultivovaných somatických buňkách savců strukturní chromozomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v kultivovaných somatických buňkách savců strukturní chromozomové aberace.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— vlastnosti karyotypu a vhodnost použitého typu buněk,

— popřípadě nepřítomnost mykoplasmat,

— informace o délce buněčného cyklu,

— pohlaví dárce krve, zda byla použita plná krev nebo separované lymfocyty, použitý mitogen,

— případně počet pasáží,

— případně metody udržování buněčné kultury,

— modální hodnota počtu chromozomů.

Zkušební podmínky:

— identifikace látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka expozice buněk,

— odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti, jsou-li k dispozici,

— složení média, případně koncentrace CO_2,

▼B

— koncentraci zkoušené látky,

— objem vehikula a přidané zkoušené látky,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— délka expozice,

— případně hustota buněk při nasazení,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,

— pozitivní a negativní kontroly,

— metody přípravy preparátů,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných metafází,

— metody stanovení toxicity,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— známky toxicity, např. stupeň konfluence, údaje o buněčném cyklu, počty buněk, mitotický index,

— známky srážení,

— údaje o pH a osmolalitě expozičního média, pokud byly stanoveny,

— definice aberací, včetně gapů,

— počet buněk s chromozomovými aberacemi a typy aberací zvlášť pro každou exponovanou a kontrolní kulturu,

— změny ploidie, pokud byly pozorovány,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

2) Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427–432.

▼B

3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl.10), 1–175.

4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res,. 257, 147–204.

5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297–305.

6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347–364.

7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173–215.

8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83–90.

9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66, 277–290.

10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175–177.

11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, 241–261.

13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, 139–149.

15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

▼B

16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795–801.

17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, 403–413.

18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362–1364.

▼B

B.11 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ *IN VIVO*

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 475 – Zkouška na chromozomové aberace v buňkách kostní dřeně savců (1997).

1.1 ÚVOD

Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vivo* je používána pro detekci strukturních chromozomových aberací indukovaných zkoušenou látkou v buňkách kostní dřeně savců, obvykle hlodavců (1, 2, 3, 4). Rozlišují se dva typy strukturních aberací – chromozomové a chromatidové. Nárůst polyploidie může znamenat, že chemická látka má schopnost indukovat numerické aberace. v případě většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromozomové aberace se rovněž vyskytují. Chromozomové mutace a související jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že chromozomové mutace a související jevy způsobující změny v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory, mají podíl na indukci rakoviny u člověka a v experimentálních systémech.

Při této zkoušce jsou rutinně používáni hlodavci. Cílovou tkání je v této zkoušce kostní dřeň, poněvadž je vysoce vaskularizovanou tkání a obsahuje populaci buněk s rychlým cyklem, které se snadno izolují a zpracovávají. Jiné druhy a cílové tkáně nejsou předmětem této metody.

Tato zkouška na chromozomové aberace je zvláště určená k posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo*, farmakokinetiku a procesy reparace DNA, třebaže se mohou u různých druhů a tkání měnit. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum mutagenních účinků zjištěných zkouškou *in vitro*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozomy se 4, 8, 16… chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jednoho chromatidu a s minimální odchylkou chromatid.

Numerická aberace: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitého typu buněk.

▼B

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (*n*) jiný než diploidní (tj. 3*n*, 4*n* atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozomální nebo interchromozomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata jsou vystavena zkoušené látce vhodným způsobem a ve vhodném okamžiku po aplikaci se usmrtí. Před usmrcením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemide®). Z buněk kostní dřeně se poté připraví preparáty chromozomů, obarví se a analyzují se chromozomové aberace buněk v metafázi.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Běžně je používán potkan, myš a křeček čínský, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný savčí druh. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

▼B

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly pro obě pohlaví. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly poskytovat strukturní aberace *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se očekává, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby byla pozitivní kontrola podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v jejím případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu mohou být použity chemické látky ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady pozitivních a negativních kontrol:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid cyklofosfamid monohydrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

V okamžiku každého odběru by měl být proveden odběr u negativních kontrol, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum a jež jinak podstupují stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s chromozomovými aberacemi. Provádí-li se pro negativní kontrolu jeden odběr, je nejvhodnějším okamžikem doba prvního odběru. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá exponovaná a kontrolní skupina se skládá z alespoň pěti analyzovatelných zvířat pro každé pohlaví. Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky by měly být pokud možno podávány jednorázově. Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu. Jiné režimy podávání by měly být vědecky zdůvodněny.

▼B

Vzorky by měly být odebrány ve dvou různých intervalech od aplikace podané v jednom dni. U hlodavců se odběr provádí po takové době od aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu (jenž trvá obvykle 12–18 hodin). Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené látky a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální okamžik pro stanovení chromozomových aberací, doporučuje se provést další odběr po 24 hodinách od prvního odběru. Je-li aplikace rozložena do více než jednoho dne, měl by být odběr proveden po takové době od poslední aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myši je tato doba přibližně 3–5 hodin; u křečka čínského je tato doba přibližně 4–5 hodin. Z kostní dřeně se odeberou buňky a analyzují se na chromozomové aberace.

1.5.3 **Dávkování**

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu dávek, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (5). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávky. Tyto úrovně dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě. Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající v kostní dřeni některé známky toxicity (např. více než 50 % snížení mitotického indexu).

1.5.4 **Limitní zkouška**

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nezbytnou. U déle trvajících studií je limitní dávkou pro 14denní aplikaci 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den a pro delší než 14denní aplikaci je limitní dávkou 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B

1.5.6 **Příprava preparátů pro analýzu chromozomů**

Ihned po usmrcení se odebere kostní dřeň, hypotonizuje se a fixuje. Buňky se nanesou na podložní sklíčka a obarví se.

1.5.7 **Analýza**

Jako měřítko cytotoxicity by měl být u všech exponovaných zvířat (včetně pozitivních kontrol) a u neexponovaných zvířat pro negativní kontrolu stanoven mitotický index, a to alespoň u 1 000 buněk na jedno zvíře.

U každého zvířete by mělo být analyzováno alespoň 100 buněk. Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací. Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Protože při fixaci často dochází ke chromozomálním zlomům nebo ke ztrátě chromozomů u části buněk v metafázi, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu odpovídajícímu číslu 2n ± 2.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk, počet aberací na buňku a počet buněk s chromozomovou aberací (chromozomovými aberacemi) vyjádřený v procentech. Pro exponované a kontrolní skupiny by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahrnují se do celkové četnosti aberací. Neexistuje-li důkaz o rozdílu v odpovědi mezi pohlavími, mohou být pro statistickou analýzu údaje pro obě pohlaví zkombinovány.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst relativního počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s aberacemi pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (6). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Nárůst polyploidie může znamenat, že zkoušená látka má potenciál indukovat numerické chromozomové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (7, 8).

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

▼B

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na chromozomové aberace *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v kostní dřeni testovacího druhu chromozomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v kostní dřeni testovacího druhu chromozomové aberace.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do krevního oběhu, nebo specificky do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— údaje o přípravě zkoušené látky,

— údaje o podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,

— případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,

— metody stanovení toxicity,

▼B

— identifikace látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka aplikace,

— metody přípravy preparátů,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,

— celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— změny ploidie, pokud byly pozorovány,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 275–306.

2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, 157–165.

3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, 305–312.

5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

▼B

6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. s. 184–232.

7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, 403–413.

8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362–1364.

▼B

B.12 MUTAGENITA – TEST SAVČÍCH ERYTROCYTÁRNÍCH MIKROJADER *IN VIVO*

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 474 – Test savčích erytrocytárních mikrojader in vivo (1997).

1.1 ÚVOD

Test savčích erytrocytárních mikrojader *in vivo* je používán pro detekci poškození chromozomů nebo mitotického aparátu erytroblastu, které je indukováno zkoušenou látkou, a to pomocí analýzy erytrocytů odebraných z kostní dřeně a/nebo buněk periferní krve, obvykle hlodavců.

Účelem testu savčích erytrocytárních mikrojader je identifikovat látky, které způsobují cytogenetické poškození, jehož výsledkem je tvorba mikrojader obsahujících nereplikující se (lagging) chromozomové fragmenty nebo celé chromozomy.

Když se erytroblast kostní dřeně mění na polychromatický erytrocyt, hlavní jádro je vypuzeno a mikrojádra, která při tom mohou vzniknout, zůstávají v cytoplasmě, která jinak jádra neobsahuje. Zviditelnění mikrojader je v těchto buňkách usnadněno tím, že neobsahují hlavní jádro. Nárůst výskytu polychromatických erytrocytů s mikrojádry v exponovaných zvířatech je známkou indukovaného chromozomového poškození.

V tomto testu je rutinně používána kostní dřeň hlodavců, poněvadž tato tkáň produkuje polychromatické erytrocyty. Stanovení nezralých (polychromatických) erytrocytů s mikrojádry v periferní krvi je rovnocenně přijatelné u kteréhokoli druhu, u něhož byla prokázána neschopnost sleziny odstraňovat erytrocyty s mikrojádry, nebo dostatečná citlivost detekovat činitele, které způsobují strukturní nebo numerické chromozomové aberace. Mikrojádra lze rozlišit řadou kritérií. Ta zahrnují identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti centromerní (kinetochorní) DNA v mikrojádře. Vyšetřuje se zejména četnost nezralých (polychromatických) erytrocytů s mikrojádry. Počet zralých (normochromatických) erytrocytů v periferní krvi, které obsahují mikrojádra, připadající na určitý počet zralých erytrocytů lze rovněž použít jako konečný výsledek zkoušky, jestliže jsou zvířata exponována čtyři týdny nebo déle.

Tento test savčích erytrocytárních mikrojade *in vivo* je zvláště vhodný k posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo* farmakokinetiku a procesy reparace DNA, třebaže se mohou lišit u různých druhů a tkání, jakož i z genetického hlediska. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum mutagenních účinků zjištěných v systémech *in vitro*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 DEFINICE

Centromera (kinetochor): oblast (oblasti) chromozomu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělící vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitosy (meiosy) nereplikujícími se (lagging) chromozomovými fragmenty nebo celými chromozomy.

Normochromatický erytrocyt: zralý erytrocyt neobsahující ribozomy, který lze rozlišit od nezralých polychromatických erytrocytů barvivem selektivním pro ribozomy.

Polychromatický erytrocyt: nezralý erytrocyt ve vývojovém mezistadiu, který ještě obsahuje ribozomy, a může být tedy rozlišen od zralých normochromatických erytrocytů barvivem selektivním pro ribozomy.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata se vhodným způsobem vystaví zkoušené látce. Při použití kostní dřeně se zvířata ve vhodném okamžiku po expozici usmrtí, odebere se kostní dřeň, připraví se preparáty a obarví se (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Při použití periferní krve se krev ve vhodném okamžiku po expozici odebere, rozetřením se připraví preparát a obarví se (4, 8, 9, 10). Při studiích s periferní krví by měla mezi poslední expozicí a sklizením buněk uplynout co nejkratší doba. Preparáty jsou analyzovány na přítomnost mikrojader.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Při použití kostní dřeně se jako testovací zvíře doporučuje myš nebo potkan, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný savčí druh. Při použití periferní krve se doporučuje myš. Lze však použít jakýkoli vhodný druh savce za předpokladu, že jde o druh, u něhož slezina neodstraňuje erytrocyty s mikrojádry, nebo druh vykazující dostatečnou citlivost detekovat činitele, které způsobují strukturní nebo numerické chromozomové aberace. Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

▼B

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován.

1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly pro obě pohlaví. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly produkovat mikrojádra *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se očekává, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby pozitivní kontrola byla podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v tomto případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid cyklofosfamid monohydrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

▼B

V okamžiku odběru by měl být proveden odběr u skupiny negativní kontroly, které je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum a která jinak podstupuje stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s mikrojádry. Provádí-li se pro negativní kontrolu jeden odběr, je nejvhodnějším okamžikem doba prvního odběru. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

Při použití periferní krve může být jako negativní kontrola přijatelný také vzorek krve odebraný před expozicí, pouze však u krátkých studií s periferní krví (např. 1–3 aplikace) za předpokladu, že výsledné údaje budou v rozpětí, které se na základě dosavadních kontrol očekává.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá exponovaná a kontrolní skupina se musí skládat z alespoň pěti analyzovatelných zvířat pro každé pohlaví (11). Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán aplikace**

Nelze doporučit žádný standardní plán (tj. jednu, dvě nebo tři aplikace v intervalu 24 hodin). Vzorky ze studií s prodlouženým režimem podávání jsou přijatelné, pokud se u těchto studií prokáží pozitivní výsledky, nebo – v případě negativních studií – pokud byla prokázána toxicita nebo byla uplatněna limitní dávka a podávání pokračuje až do okamžiku odběru. Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu.

Test může být proveden dvěma způsoby:

a) zkoušená látka se aplikuje zvířatům jednou. Vzorky kostní dřeně se odeberou alespoň dvakrát, přičemž první odběr se provede nejdříve 24 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 48 hodin po aplikaci a s přiměřeným odstupem mezi odběry. Odběr dříve než 24 hodin po aplikaci musí být zdůvodněn. Vzorky periferní krve se odeberou alespoň dvakrát, přičemž první odběr se provede nejdříve 36 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 72 hodin po aplikaci a po prvním odběru se dodrží odpovídající odstup. Je-li po prvním odběru pozorována pozitivní odpověď, není další odběr nutný;

▼B

b) jsou-li podávány dvě nebo více dávek denně (např. dvě nebo více dávek v intervalu 24 hodin), měly by být vzorky při použití kostní dřeně odebrány jednou po 18 až 24 hodinách po poslední aplikaci a při použití periferní krve jednou po 36 až 48 hodinách po poslední aplikaci (12).

Podle potřeby mohou být navíc použity jiné doby odběru.

1.5.3 **Dávkování**

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu dávek, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, jež se použijí v hlavní studii (13). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávky. Tyto úrovně dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě. Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající v kostní dřeni některé známky toxicity (např. snížení podílu nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů v kostní dřeni nebo v periferní krvi).

1.5.4 **Limitní zkouška**

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nezbytnou. U déle trvajících studií je limitní dávkou pro 14denní aplikaci 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den a pro delší než 14denní aplikaci je limitní dávkou 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B

1.5.6 **Příprava kostní dřeně nebo krve**

Buňky kostní dřeně se obvykle získávají z femuru nebo tibie ihned po usmrcení. Buňky se odeberou z femuru nebo tibie a zavedenými metodami se preparují a obarví. Periferní krev se získává z ocasní žíly nebo jiné vhodné krevní cévy. Krevní buňky se ihned supravitálně obarví (8, 9, 10), nebo se připraví preparáty roztěrem a poté se obarví. Použitím barviva specifického pro DNA (např. akridinová oranž (14) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (15)) se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva nespecifického pro DNA. Tato výhoda nebrání použití konvenčních barviv (např. Giemsa). Přídavné systémy (např. celulosová kolona k odstranění buněk obsahujících jádra (16)) lze použít za předpokladu, že se prokázala odpovídající funkčnost těchto systémů pro preparaci mikrojader v laboratoři.

1.5.7 **Analýza**

Pro každé zvíře se stanoví podíl nezralých erytrocytů z celkového (nezralé + zralé) množství erytrocytů, přičemž se v případě kostní dřeně použije celkově alespoň 200 erytrocytů a v případě periferní krve alespoň 1 000 erytrocytů (17). Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. U každého zvířete se vyšetří alespoň 2 000 nezralých erytrocytů na výskyt mikrojader v nezralých erytrocytech. Další informace mohou být získány vyšetřením zralých erytrocytů na výskyt mikrojader. Při mikroskopické analýze by neměl být podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů menší než 20 % kontrolní hodnoty. Jestliže jsou zvířata exponována nepřetržitě čtyři týdny nebo déle, lze také vyšetřit na výskyt mikrojader alespoň 2 000 zralých erytrocytů na jedno zvíře. Systémy pro automatickou analýzu (analýza obrazu a průtoková cytometrická analýza buněčné suspenze) jsou po odpovídajícím zdůvodnění a validaci přijatelnými alternativami manuálního hodnocení.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé analyzované zvíře by měl být uveden počet vyšetřených nezralých erytrocytů, počet nezralých erytrocytů s mikrojádry a počet nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů. Jestliže jsou zvířata exponována nepřetržitě čtyři týdny nebo déle, měly by být také uvedeny údaje o zralých erytrocytech, byly-li shromažďovány. Pro každé zvíře se uvede podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů a případně množství erytrocytů s mikrojádry vyjádřené v procentech. Neexistuje-li důkaz o rozdílu v odpovědi mezi pohlavími, mohou být pro statistickou analýzu údaje pro obě pohlaví zkombinovány.

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu buněk s mikrojádry v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s mikrojádry pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (18, 19). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky testu na mikrojádra znamenají, že zkoušená látka indukuje mikrojádra, jež jsou důsledkem chromozomového poškození nebo poškození mitotického aparátu erytroblastu testovacího druhu. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neprodukuje mikrojádra v nezralých erytrocytech testovacího druhu.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do krevního oběhu, nebo specificky do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje k pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

▼B

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— údaje o přípravě zkoušené látky,

— údaje o podání zkoušené látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,

— případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,

— metody přípravy preparátů,

— metody stanovení toxicity,

— kritéria hodnocení mikrojader v nezralých erytrocytech,

— počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— známky toxicity,

— podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů,

— počet nezralých erytrocytů s mikrojádry uvedený samostatně pro každé zvíře,

— střední hodnota ± směrodatná odchylka počtu nezralých erytrocytů s mikrojádry ve skupině,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy a metody,

— údaje o souběžné a dosavadní negativní kontrole,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole.

— Rozbor výsledků.

— Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, 187–190.

2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, 9–15.

3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res. 123: 61–118.

4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, 29–80.

▼B

5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: „Developments in Science and Practice of Toxicology“, Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555–558.

6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res. 189: 103–112.

7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol. 14: 513–522.

8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Res., 245, 245–249.

9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., 278, 83–98.

10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (-CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 153–159.

11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, 293–304.

12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 313–319.

13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, 241–247.

15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, 269–275.

16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, 91–104.

17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, 97–99.

▼B

18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.13/14 **MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI**

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 471 – Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (1997).

1.1 ÚVOD

Při zkoušce na reverzní mutace s bakteriemi se používají bakteriální kmeny závislé na aminokyselinách *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*, k detekci bodových mutací, které zahrnují substituci, adici a deleci jednoho nebo několika párů bází DNA (1, 2, 3). Podstata této zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi spočívá v detekci mutací, které revertují mutace obsažené v testovacích kmenech, a obnovují tak funkční schopnost bakterií syntetizovat esenciální aminokyseliny. Bakterie po reverzi jsou detekovány díky své schopnosti růst v nepřítomnosti aminokyselin, které jsou vyžadovány mateřským testovacím kmenem.

Bodové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že bodové mutace v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory mají podíl na tvorbě rakoviny u člověka a u pokusných zvířat. Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je rychlá, nenákladná a relativně snadná. Mnoho testovacích kmenů má řadu vlastností, díky nimž jsou citlivější na detekci mutací, včetně responsivních sekvencí DNA na reverzních místech, zvýšené permeability buněk pro velké molekuly a eliminaci reparačních systémů DNA nebo zlepšení reparačních procesů DNA náchylných k chybám. Specifičnost testovacích kmenů může poskytnout některé užitečné informace o typech mutací, jež jsou indukovány genotoxickými činiteli. Pro zkoušky na reverzní mutací s bakteriemi je k dispozici velmi rozsáhlá databáze výsledků pro širokou škálu struktur a dále byly vyvinuty dobře vyzkoušené metody zkoušení chemických látek, včetně těkavých sloučenin, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Zkouška na reverzní mutace: s bakteriemi *Salmonella typhimurium* nebo *Escherichia coli* slouží k detekci mutací v kmeni vyžadujícím aminokyseliny (histidin resp. tryptofan), přičemž vzniká kmen nezávislý na vnějším přísunu aminokyseliny.

Mutageny substituce párů bází: činitele, jež způsobují změny v bázích DNA. Při zkoušce reverzních mutací se mohou tyto změny vyskytnout na místě původní mutace nebo jiném místě bakteriálního genomu.

Posunové mutageny: činitele, jež způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází DNA a posunují tak čtecí rámec RNA.

▼B

1.3 VÝCHOZÍ ÚVAHY

Při zkouškách na reverzní mutace s bakteriemi se využívají prokaryotické buňky, které se liší od buněk savců faktory, jako jsou příjem, metabolismus, chromozomová struktura a reparační procesy DNA. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Metabolické aktivační systémy *in vitro* nemohou zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Zkouška tedy neposkytuje přímou informaci o mutagenním a karcinogenním potenciálu látky pro savce.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je zpravidla využívána pro počáteční vyšetření genotoxické aktivity, a zejména aktivity vyvolávající bodové mutace. Z rozsáhlé databáze vyplývá, že mnoho chemických látek, které jsou v této zkoušce pozitivní, vykazuje mutagenní aktivitu i v jiných zkouškách. Existují příklady mutagenních činitelů, které nejsou detekovány touto zkouškou. Příčiny těchto skutečností lze spatřovat ve specifické povaze detekovaného konečného jevu, v rozdílech v metabolické aktivaci nebo v rozdílech v biologické dostupnosti. Na druhé straně faktory, které zvyšují citlivost zkoušky na reverzní mutace na bakteriích, mohou vést k nadhodnocení mutagenní aktivity.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi nemusí být vhodná pro určité třídy chemických látek, například vysoce baktericidní sloučeniny (např. určitá antibiotika) a pro chemické látky, o nichž se předpokládá (nebo o nichž se ví), že specificky zasahují do replikačního systému buněk savců (např. některé inhibitory topoisomerasy a některé analogy nukleosidů). V takových případech mohou být vhodnější zkoušky mutagenity u savců.

Přestože mnoho sloučenin, pro něž je tato zkouška pozitivní, je karcinogenní pro savce, není korelace absolutní. Závisí na chemické třídě a existuje mnoho karcinogenů, jež nejsou detekovány touto zkouškou, neboť působí jinými, negenotoxickými mechanismy, nebo mechanismy, které v bakteriálních buňkách neexistují.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Suspenze bakteriálních buněk jsou vystaveny zkoušené látce, a to za přítomnosti vnějšího metabolického aktivačního systému a bez něho. Ve standardním miskovém testu se suspenze smíchají s vrchním agarem a ihned se nanesou na minimální půdu. V preinkubační metodě se zkoušená směs inkubuje a poté se před nanesením na minimální půdu smíchá s vrchním agarem. Při obou technikách se po dvou nebo třech dnech inkubace spočítají kolonie revertantů a provede se srovnání s počtem kolonií spontánních revertantů na kontrolní misce s rozpouštědlem.

Je popsáno několik postupů provedení zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi. Mezi běžně používané patří standardní miskový test (1, 2, 3, 4), preinkubační metoda (2, 3, 5, 6, 7, 8), fluktuační test (9, 10) a suspenzní metoda (11). Metody pro zkoušení plynů a par jsou popsány (12).

▼B

Zde popsané postupy se týkají hlavně standardního miskového testu a preinkubačních metod. Každá z nich je přijatelná pro provádění experimentů jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Některé látky lze účinněji detekovat za použití preinkubační metody. Tyto látky patří do chemických tříd, do nichž patří mezi jiným krátké alifatické nitrosaminy, dvojvazné kovy, aldehydy, azobarviva a diazoniové sloučeniny, pyrrolizidinové alkaloidy, allylové sloučeniny a nitrosloučeniny (3). Přitom se připouští, že určité třídy mutagenů nelze vždy detekovat standardními postupy, jako je standardní miskový test nebo preinkubační metoda. Měly by být považovány za „zvláštní případy" a k jejich detekci se důrazně doporučuje použít alternativní postupy. Je možné identifikovat tyto „zvláštní případy" (společně s příklady postupů jejich detekce): azobarviva a diazoniové sloučeniny (3, 5, 6, 13), plyny a těkavé chemické látky (12, 14, 15, 16) a glykosidy (17, 18). Odchylka od standardního postupu musí být vědecky zdůvodněna.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Přípravky**

1.5.1.1 *Bakterie*

Čerstvé kultury bakterií by měly být kultivovány do pozdní exponenciální fáze nebo do časné stacionární fáze růstu (přibližně 10^9 buněk na ml). Buňky v pozdní stacionární fázi by neměly být použity. Je důležité, aby měly použité bakterie vysoký titr životaschopných bakterií. Titr může být prokázán buď na základě dosavadních kontrolních údajů o růstové křivce, nebo pro každou zkoušku stanovením počtu životaschopných buněk na miskách.

Doporučená inkubační teplota je 37 °C.

Mělo by být použito alespoň pět kmenů bakterií. Mezi nimi by měly být čtyři kmeny *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 nebo TA97a nebo TA97; TA98; TA100), jejichž odpověď se ukázala v různých laboratořích jako spolehlivá a reprodukovatelná. Tyto čtyři kmeny *S. typhimurium* mají pár bází GC na primárním reverzním místě a je známo, že jejich prostřednictvím nelze detekovat určité oxidační mutageny, činitele způsobující překřížení vláken DNA a hydraziny. Tyto látky mohou být detekovány kmeny *E. coli* WP2 strains nebo *S. typhimurium* TA102 (19), které mají na primárním reverzním místě pár bází AT. Doporučená kombinace kmenů je tedy tato:

— *S. typhimurium* TA1535,

— *S. typhimurium* TA1537 nebo TA97 nebo TA97a,

— *S. typhimurium* TA98,

— *S. typhimurium* TA100 a

— *E. coli* WP2 uvrA, nebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), nebo *S. typhimurium* TA102.

Pro detekci mutagenů způsobujících překřížení vláken DNA může být vhodnější zařadit TA102 nebo přidat kmen *E. coli* (např. *E. coli* WP2 nebo *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Měly by být použity zavedené postupy přípravy kmenové kultury, verifikace markeru a skladování. Potřeba aminokyseliny pro růst by měla být prokázána pro každou zmrazenou kmenovou kulturu (histidin pro kmeny *S. typhimurium* a tryptofan pro *E. coli*). Podobně by měly být kontrolovány jiné fenotypové charakteristiky, jmenovitě podle potřeby přítomnost nebo nepřítomnost R-faktoru plasmidů (tj. ampicilinová rezistence u kmenů TA98, TA100 a TA97a nebo TA97, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101) a ampicilinová a tetracyklinová rezistence u kmene TA102); přítomnost charakteristických mutací (tj. rfa mutací u *S. typhimurium* citlivostí na krystalovou violeť a uvrA mutace u *E. coli* nebo uvrB mutací u *S. typhimurium,* citlivostí na ultrafialové světlo) (2)(3). Kmeny by měly rovněž dávat počty kolonií spontánních revertantů na misce v rozmezí četností očekávaných na základě dosavadních údajů laboratorních kontrol a nejlépe v rozmezí uvedeném v literatuře.

1.5.1.2 *Médium*

Použije se vhodný minimální agar (např. obsahující minimální půdu E (Vogel-Bonner) a glukosu) a vrchní agar obsahující histidin a biotin nebo tryptofan umožňující několik buněčných dělení (1, 2, 9).

1.5.1.3 *Metabolická aktivace*

Bakterie by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodným systémem metabolické aktivace a bez něho. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem doplněná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců ošetřených prostředkem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (1, 2) nebo fenobarbitonu a β-naftoflavonu (18, 20, 21). Postmitochondriální frakce je obvykle používána v koncentracích v rozmezí 5 až 30 % obj. ve směsi S9. Volba a podmínky metabolického aktivačního systému může záviset na třídě zkoušené chemické látky. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce. U azobarviv a diazoniových sloučenin může být vhodnější použití redukčního metabolického aktivačního systému (6, 13).

1.5.1.4 *Zkoušená látka nebo přípravek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na bakterie rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím bakterií a s aktivitou S9 (22). Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu.

▼B

1.5.2 **Zkušební podmínky**

1.5.2.1 *Zkušební kmeny (viz 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyššího množství zkoušené látky patří cytotoxicita a rozpustnost v konečné směsi pro aplikaci.

Může být užitečné stanovit toxicitu a nerozpustnost v předběžných experimentech. Cytotoxicita může být detekována snížením počtu kolonií revertantů, vymizením nebo zeslabením bakteriálního podkladu nebo snížením stupně přežití exponovaných kultur. Cytotoxicita látky se může změnit v přítomnosti metabolických aktivačních systémů. Nerozpustnost by měla být posouzena na základě viditelného srážení v konečné směsi za skutečných zkušebních podmínek.

Doporučená maximální zkušební koncentrace pro rozpustné necytotoxické látky je 5 mg/misku nebo 5 µl/misku. U necytotoxických látek nerozpustných při koncentracích 5 mg/misku nebo 5 µl/misku by měla být jedna nebo více zkušebních koncentrací takových, aby látky byly v konečné směsi pro aplikaci nerozpustné. Zkoušené látky, které jsou cytotoxické již při koncentracích nižších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku, by měly být zkoušeny až do cytotoxické koncentrace. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

Mělo by být použito alespoň pět různých analyzovatelných koncentrací zkoušené látky, přičemž při prvním experimentu by měly být intervaly mezi zkušebními body rovny přibližně polovině dílku logaritmické stupnice (tj. $\sqrt{10}$). Menší intervaly jsou vhodné v případě, kdy se vyšetřuje křivka závislosti odpovědi na koncentraci. Zkoušení koncentrací vyšších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku může být zváženo při hodnocení látek obsahujících významné množství potenciálně mutagenních nečistot.

1.5.2.3 *Negativní a pozitivní kontroly*

Součástí každého stanovení by měly být kmenově specifické pozitivní a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontroly s metabolickou aktivací a bez ní. Pro pozitivní kontrolu by měly být vybrány koncentrace dokládající účinnost každé zkoušky.

V případě zkoušek s použitím metabolického aktivačního systému by měla být látka(látky) pro pozitivní kontrolu vybrána(vybrány) na základě typu použitého kmene bakterií.

Příkladem vhodné pozitivní kontroly u zkoušky s metabolickou aktivací jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
9,10-dimethylanthracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenzo[*a*]anthracen	57-97-6	200-359-5
benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-6
2-aminoanthracen	613-13-8	210-330-9

▼B

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
cyklofosfamid	50-18-0	
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	200-015-4

Tato látka je vhodnou pozitivní kontrolou pro metodu redukční metabolické aktivace:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
CI Direct Red 28	573-58-0	209-358-4

2-aminoanthracen by neměl být použit jako jediný indikátor účinnosti směsi S9. Při použití 2-aminoanthracenu by měla být každá šarže S9 charakterizována mutagenem, který vyžaduje metabolickou aktivaci mikrosomálními enzymy, například benzo[a]pyren nebo 7,12-dimethylbenzo[a]anthracen.

Příkladem kmenověspecifické pozitivní kontroly u zkoušky bez vnější metabolické aktivace jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS	Kmen
azid sodný	26628-22-8	247-852-1	TA1535 a TA100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA1537, TA97 a TA97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA1537, TA97 a TA97a
kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA a TA102
1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
α[(5-nitro-2-furyl)methyliden]furan-2-acetamid (AF2)	3688-53-7		kmeny obsahující plasmidy

Pro pozitivní kontrolu mohou být použity jiné vhodné referenční látky. Pro pozitivní kontrolu by mělo být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici.

Měly by být použity negativní kontroly skládající se ze samotného rozpouštědla nebo vehikula, bez zkoušené látky, zpracované jinak stejným způsobem jako exponované skupiny. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

▼B

1.5.3 **Postup**

U standardní miskové metody (1, 2, 3, 4) bez metabolické aktivace se obvykle smíchá 0,05 ml nebo 0,1 ml zkušebních roztoků, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury (obsahující přibližně 10^8 životaschopných buněk) a 0,5 ml sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. V případě zkoušky s metabolickou aktivací se obvykle smíchá 0,5 ml metabolické aktivační směsi obsahující přiměřené množství postmitochondriální frakce (v rozmezí 5 až 30 % obj. v metabolické aktivační směsi) s vrchním agarem (2,0 ml) a zároveň s bakteriemi a zkoušenou látkou nebo zkušebním roztokem. Obsah každé zkumavky se promíchá a přelije přes povrch minimálního agaru na misce. Před inkubací se nechá vrchní agar ztuhnout.

U preinkubační metody (2, 3, 5, 6) se zkoušená látka nebo zkoušený roztok před smícháním s vrchním agarem a přelitím přes povrch minimálního agaru na misce obvykle 20 minut nebo déle preinkubuje s testovacím kmenem (obsahujícím přibližně 10^8 životaschopných buněk) a sterilním pufrem nebo metabolickým aktivačním systémem (0,5 ml) při 30–37 °C. Obvykle se smíchá 0,05 nebo 0,1 ml zkoušené látky nebo zkušebního roztoku, 0,1 ml bakterií a 0,5 ml směsi S9 nebo sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. Zkumavky by měly být během inkubace provzdušňovány na třepačce.

K dostatečnému odhadu odchylky by měly být při každé úrovni dávky použity 3 misky. Použití dvou misek je přijatelné po vědeckém zdůvodnění. Případná ztráta misky nemusí znamenat znehodnocení zkoušky.

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (12, 14, 15, 16).

1.5.4 **Inkubace**

Všechny misky v dané zkoušce by měly být inkubovány při 37 °C po 48–72 hodinách. Po uplynutí inkubační doby se zjistí počet kolonií revertantů na misku.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Předloženými údaji by měly být počty kolonií revertantů připadající na misku. Měl by být rovněž uveden počet kolonií revertantů jak na miskách s negativní kontrolou (kontrola rozpouštědla a případně neexponovaná kontrola), tak na miskách s pozitivní kontrolou. Počty na jednotlivých miskách, střední hodnoty počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka by měly být předloženy pro zkoušenou látku a pozitivní a negativní kontrolu (neexponovanou kontrolu a/nebo kontrolu rozpouštědla).

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Negativní výsledky musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací, metoda zpracování (standardní misková metoda nebo preinkubace v kapalném médiu) a podmínky metabolické aktivace.

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu kolonií revertantů na misku nad testovaný rozsah u alespoň jednoho kmene s metabolickým aktivačním systémem nebo bez něho, a to v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst tohoto počtu pro jednu nebo více koncentrací (23). Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (24). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi znamenají, že zkoušená látka indukuje v genomu kmenů *Salmonella typhimurium* a/nebo *Escherichia coli* bodové mutace substitucí bází nebo posunem čtecího rámce. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka není za podmínek zkoušky pro testovací druhy mutagenní.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Kmeny:

— použité kmeny,

— počet buněk v kultuře,

— charakteristiky kmene.

Zkušební podmínky:

— množství zkoušené látky na misku (mg/misku nebo µl/misku) s odůvodněním výběru dávky a počtu misek na koncentraci,

— použitá média,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,

— postup expozice.

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky srážení,

— počty na jednotlivých miskách,

▼B

— střední hodnota počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347–364.

2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173–215.

3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, 217–233.

4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, 69–240.

5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, 91–96.

6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. s. 273–285.

7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, 167–177.

9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, 33–42.

10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

▼B

11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, 453–465.

12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, 335–344.

13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, 33–47.

14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, 2–141.

15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, s. 249–258.

16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, 421–441.

17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, 3780–3782.

18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4961–4965.

19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, 285–291.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: „*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing“ Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175–177.

22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, 343–350.

23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, 83–91.

▼B

24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼B

B.15 **ZKOUŠENÍ MUTAGENITY A SCREENING KARCINOGENITY – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Není uvedena.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Různé haploidní a diploidní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* mohou být použity ke stanovení chemicky indukovaných genových mutací za přítomnosti metabolické aktivace nebo bez ní.

Jsou využívány přímé mutační systémy u haploidních kmenů, jako měření mutací z červených mutantů vyžadujících adenin (*ade*-1, *ade*-2) na dvojité bílé mutanty vyžadující adenin, a selektivní systémy, jako je indukce rezistence vůči kanavinu a cykloheximidu.

V nejlépe ověřeném reverzním mutačním systému se využívá haploidního kmene XV 18514C s nonsense mutacemi (ochre) *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 and *trp* 5-48, které jsou vratné působením mutagenů vyvolávajících záměnu bází, indukujících mutace ve specifickém místě nebo ochre-supresorové mutace. XV 185-14C nese rovněž marker *his* 1-7 missense mutaci, revertovanou převážně mutacemi v dalším místě, a marker *hom* 3-10, který je revertován posunovými mutageny.

U diploidních kmenů *S. cerevisiae* je jediným široce využívaným kmenem D_7, který je homozygotní pro *ilv* 1-92.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Roztoky zkoušených chemických látek a kontrol se připraví těsně před zkoušením za použití vhodného vehikula. U organických látek, které nejsou rozpustné ve vodě, se použije nejvýše 2 % (obj.) roztok v organických rozpouštědlech, jako jsou ethanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Konečná koncentrace vehikula nesmí významně ovlivnit životaschopnost buněk a charakteristiky růstu.

▼B

Metabolická aktivace

Buňky se exponují zkoušeným chemickým látkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného vnějšího metabolického aktivačního systému.

Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců, upravovaná činidly indukujícími enzymy. Použití jiných druhů, tkání, postmitochondriálních frakcí nebo postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

Zkušební podmínky

Zkušební kmeny

Nejpoužívanější kmeny pro studie genových mutací jsou haploidní kmen XV 185-14C a diploidní kmen D_7. Jiné kmeny mohou být rovněž vhodné.

Média

Pro určení počtu přežívajících a mutovaných buněk se použijí vhodná kultivační média.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Souběžně se nasadí pozitivní kontroly, neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pro každou specifickou mutační změnu se použijí odpovídající pozitivní kontrolní chemické látky.

Expoziční koncentrace

Použije se nejméně pět dostatečně odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. U toxických látek nemá nejvyšší zkoušená koncentrace snižovat přežití na méně než 5–10 %. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Podmínky inkubace

Misky se inkubují v temnu čtyři až sedm dní při 28 až 30 °C.

Frekvence spontánních mutací

Použijí se subkultury s četností spontánních mutací v obvyklém přijatelném rozmezí.

▼B

Počet misek

Pro stanovení počtu prototrofních buněk vznikajících genovými mutacemi a pro stanovení životaschopnosti buněk se použijí nejméně tři misky na jednu koncentraci. U experimentů s markery, jako je *hom* 3-10 s nízkou mutační rychlostí, se počet misek zvýší, aby byly získány statisticky relevantní údaje.

Postup

Expozice kmenů *S. cerevisiae* se obvykle provede v kapalném prostředí a zahrnuje buď buňky ve stacionární fázi, nebo rostoucí buňky. Výchozí experimenty se provedou na rostoucích buňkách: 1 – 5 × 10^7 buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 hodin při 28 až 37 °C; podle potřeby se v průběhu expozice přidá odpovídající množství metabolické aktivační směsi. Na konci expoziční doby se buňky centrifugují, promyjí a naočkují na vhodné kultivační médium. Po inkubaci se na miskách spočítají přežívající buňky a buňky s indukovanými genovými mutacemi. Jestliže je první experiment negativní, provede se druhý experiment s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první experiment pozitivní, potvrdí se vhodným nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet kolonií, počet mutací, četnost přežívajících buněk a četnost mutací. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem. Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— použitý kmen,

— zkušební podmínky: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí buňky, složení médií, teplota a délka inkubace, metabolický aktivační systém,

— podmínky expozice: úrovně expozice, postup a délka expozice, teplota při expozici, pozitivní a negativní kontroly,

— počet kolonií, počet mutantů, četnost přežívajících buněk a četnost mutací, podle možnosti vztah dávky a účinku, statistické hodnocení údajů,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.16 ZKOUŠKA NA MITOTICKOU REKOMBINACI U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Mitotickou rekombinaci u *Saccharomyces cerevisiae* lze detekovat mezi geny (obecněji mezi genem a jeho centromerou) a uvnitř genů. První případ je nazýván mitotické překřížení a vytváří reciproční produkty, zatímco druhý případ je většinou nereciproční a nazývá se genová konverze. Překřížení se obecně stanoví na základě tvorby recesivních homozygotních kolonií nebo sektorů vzniklých u heterozygotních kmenů, zatímco genová konverze se stanoví na základě tvorby prototrofních revertant vzniklých u auxotrofního heteroalelického kmene, který nese dvě různé defektní alely téhož genu. Nejčastěji používanými kmeny pro detekci mitotické genové konverze jsou D_4 (heteroalelický v *ade* 2 a *trp* 5) D_7 (heteroalelický v *trp* 5) BZ_{34} (heteroalelický v *arg* 4) a JDl (heteroalelický v *his* 4 a *trp* 5). Mitotické překřížení produkující červené a růžové homozygotní sektory lze stanovit u D_5 nebo D_7 (který slouží rovněž k měření mitotické genové konverze a reverzních mutací v *ilv* 1-92 oba kmeny jsou heteroalelické pro komplementární alely *ade* 2.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Roztoky zkoušených chemických látek a kontrol nebo referenčních sloučenin se připraví těsně před zkoušením za použití vhodného vehikula. U organických látek, které nejsou rozpustné ve vodě, se použije nejvýše 2 % (obj.) roztok v organických rozpouštědlech, jako jsou ethanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Konečná koncentrace vehikula nesmí významně ovlivnit životaschopnost buněk a charakteristiky růstu.

Metabolická aktivace

Buňky se exponují zkoušeným chemickým látkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného vnějšího metabolického aktivačního systému. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců, upravovaná činidly indukujícími enzymy. Použití jiných druhů, tkání, postmitochondriálních frakcí nebo postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

▼B

Zkušební podmínky

Zkušební kmeny

Nejpoužívanějšími kmeny jsou diploidní kmeny D_4, D_5, D_7 a JD1. Jiné kmeny mohou být rovněž vhodné.

Média

Pro určení počtu přežívajících buněk a četnosti mitotické rekombinace se použijí vhodná kultivační média.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Souběžně se nasadí pozitivní kontroly, neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pro každou specifickou rekombinační změnu se použijí odpovídající pozitivní kontrolní chemické látky.

Expoziční koncentrace

Použije se nejméně pět dostatečně odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. Mezi faktory, které mají být zohledněny, patří cytotoxicita a rozpustnost. Nejnižší koncentrace nesmí mít vliv na životaschopnost buněk. U toxických látek nemá nejvyšší zkoušená koncentrace snižovat přežití na méně než 5–10 %. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Buňky mohou exponovány zkoušené chemické látce buď ve stacionární fázi, nebo během růstu po dobu až 18 hodin. Dlouhodobě exponované kultury však mají být mikroskopicky kontrolovány na tvorbu spor, jejichž přítomnost zkoušku znehodnocuje.

Podmínky inkubace

Misky se inkubují v temnu čtyři až sedm dní při 28 až 30 °C. Misky použité pro průkaz červených a růžových homozygotních sektorů tvořených mitotickým překřížením se před počítáním umístí v chladničce (při přibližně 4 °C) na další 1–2 dny, aby se mohly utvořit odpovídající pigmentované kolonie.

Četnost spontánní mitotické rekombinace

Použijí se subkultury s četností spontánní mitotické rekombinace v obvyklém přijatelném rozmezí.

▼B

Počet misek

Pro stanovení počtu prototrofních buněk vznikajících mitotickou genovou konverzí a pro stanovení životaschopnosti buněk se použijí nejméně tři misky na jednu koncentraci. Pro stanovení recesivní homozygocity tvořené mitotickým překřížením se počet misek zvýší, aby bylo dosaženo dostatečného počtu kolonií.

Postup

Expozice kmenů *S. cerevisiae* se obvykle provede v kapalném prostředí a zahrnuje buď buňky ve stacionární fázi, nebo rostoucí buňky. Výchozí experimenty se provedou na rostoucích buňkách. 1 – 5 × 10^7 buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 hodin při 28 až 37 °C; podle potřeby se v průběhu expozice přidá odpovídající množství metabolické aktivační směsi.

Na konci expoziční doby se buňky centrifugují, promyjí a naočkují na vhodné kultivační médium. Po inkubaci se na miskách spočítají přežívající buňky a počet indukcí mitotické rekombinace.

Jestliže je první experiment negativní, provede se druhý experiment s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první experiment pozitivní, potvrdí se vhodným nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet kolonií, počet rekombinací, četnost přežívajících buněk a četnost rekombinací.

Výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— použitý kmen,

— zkušební podmínky: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí buňky, složení médií, teplota a délka inkubace, metabolický aktivační systém,

— podmínky expozice: úroveň expozice, postup a délka expozice, teplota při expozici, pozitivní a negativní kontroly,

— počet kolonií, počet rekombinací, četnost přežívajících buněk a četnost rekombinací, podle možnosti vztah dávky a účinku, statistické vyhodnocení údajů,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.17 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO*

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 476, Zkouška na genové mutace v buňkách savců *in vitro* (1997).

1.1 ÚVOD

Zkoušku na genové mutace v buňkách savců *in vitro* lze použít pro detekci genových mutací indukovaných chemickými látkami. Mezi vhodné buněčné linie patří buňky lymfomu L5178Y myší, buněčné linie CHO, CHOAS52 a V79 křečka čínského a lymfoblastoidní buňky TK6 člověka (1). U těchto buněčných linií jsou nejpoužívanější mírou genetických účinků mutace genů pro thymidinkinasu (TK) a hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasu (HPRT) a transgen xanthin-guaninfosforibosyltransferasy (XPRT). Zkoušky na mutace TK, HPRT a XPRT detekují různé spektrum genetických událostí. Autosomální lokace TK a XPRT může umožnit detekci genetických událostí (např. rozsáhlé delece), které nelze detekovat v HPRT lokusu na X chromosomech (2, 3, 4, 5, 6).

Ve zkoušce na genové mutace v buňkách savců *in vitro* lze použít kultury zavedených linií buněk nebo buněčné kmeny. Buňky se vybírají podle schopnosti růstu v kultuře a stálosti četnosti spontánních mutací.

Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Tento metabolický aktivační systém nemůže zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Je třeba se zcela vyvarovat podmínek, které by vedly k pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu. K pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu, může dojít změnou pH, osmolality nebo vysokých úrovní cytotoxicity (7).

Tato zkouška se používá ke zjištění možných mutagenů a karcinogenů pro savce. Mnoho sloučenin, pro něž je tato zkouška pozitivní, jsou karcinogeny savců; mezi touto zkouškou a karcinogenitou však není absolutní korelace. Korelace závisí na chemické třídě a přibývají důkazy o tom, že existují karcinogeny, které nejsou zjištěny touto zkouškou, neboť zřejmě působí jinými, negenotoxickými mechanismy, nebo mechanismy, které v bakteriálních buňkách neexistují (6).

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Přímá mutace: genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity kódovaných bílkovin.

Mutageny substituce párů bází: látky, které způsobují substituci jednoho nebo více párů bází v DNA.

Posunové mutageny: látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

▼B

Doba exprese fenotypu: doba, během níž vymizí z nově mutovaných buněk nezměněné genové produkty.

Četnost mutantů: počet pozorovaných mutantních buněk dělený počtem životaschopných buněk.

Relativní celkový růst: nárůst počtu buněk v čase ve srovnání s kontrolní populací buněk; vypočte se jako součin poměru rychlosti růstu v suspenzi a v negativní kontrole a relativní účinnosti klonování vzhledem k negativní kontrole.

Relativní růst v suspenzi: nárůst počtu buněk v průběhu exprese vzhledem k negativní kontrole.

Životaschopnost: účinnost klonování buněk v okamžiku nasazení na misku za selektivních podmínek po expresi.

Přežití: účinnost klonování buněk při nasazení na misku na konci období expozice; přežití je obvykle vyjádřeno v poměru k přežití kontrolní populace buněk.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Buňky, které v důsledku mutace $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ neobsahují thymidinkinasu (TK) jsou rezistentní k cytotoxickým účinkům analogu pyrimidinu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující thymidinkinasu jsou citlivé na TFT, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TFT, zatímco normální buňky, které obsahují thymidinkinasu tuto schopnost nemají. Podobně lze u buněk s deficientním HPRT nebo XPRT provést selekci prostřednictvím rezistence k 6thioguaninu (TG) nebo 8azaguaninu (AG). Vlastnosti zkoušené látky by měly být pečlivě zváženy, jestliže je ve zkoušce na genové mutace v buňkách savců zkoušen analog báze nebo sloučenina podobná selekčnímu činidlu. Mělo by být například vyšetřeno jakékoli podezření na selektivní toxicitu zkoušené látky pro mutantní nebo nemutantní buňky. Při zkoušení chemických látek, které mají podobnou strukturu jako selekční činidlo, musí tedy být potvrzena účinnost systému nebo činidla pro selekci (8).

Buňky v suspenzní nebo jednovrstevné kultuře jsou vhodnou dobu vystaveny zkoušené látce jak s metabolickou aktivací, tak bez ní, a subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů (9, 10, 11, 12, 13). Cytotoxicita se obvykle zjistí stanovením relativní účinnosti klonování (přežití) nebo stanovením relativního celkového růstu kultur po uplynutí doby expozice. Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý zvolený lokus a typ buněk, aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací. Četnost mutantů se stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních buněk a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočte z počtu mutantních kolonií v selekčním médiu a počtu kolonií v médiu bez selekčního činidla.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Buňky*

Pro použití v této zkoušce jsou k dispozici různé typy buněk, včetně subklonů buněk L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 nebo TK6. Typy buněk v této zkoušce by měly vykazovat citlivost k chemickým mutagenům, vysokou klonovací schopnost a stabilní frekvenci spontánních mutací. Buňky by měly být kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty, a v případě kontaminace by neměly být použity.

Zkoušky by měly být navrženy tak, aby měly předem stanovenou citlivost a váhu. Počet použitých buněk, kultur a koncentrací zkoušené látky by měl tyto definované parametry odrážet (14). Minimální počet buněk, které přežijí expozici a které budou použity v každém stadiu zkoušky, by měl být založen na četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je, aby byl použit počet buněk, který je desetinásobkem převrácené hodnoty četnosti spontánních mutací. Je však doporučeno, aby bylo použito alespoň 10^6 buněk. Měly by být k dispozici dostatečné dosavadní údaje o použitém buněčném systému, aby byla doložena konzistentní výpovědní hodnota zkoušky.

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro udržování kultur by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO_2 teplota a vlhkost). Média by měla být zvolena podle selekčních systémů a typů buněk použitých při zkoušce. Je zvláště důležité, aby kultivační podmínky byly zvoleny tak, aby byly zajištěny optimální růst buněk během období exprese a schopnost jak mutovaných, tak nemutovaných buněk tvořit kolonie.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Buňky by měly být získávány z kmenových kultur, nasazeny do kultivačního média a inkubovány při 37 °C. Před použitím v této zkoušce může být nezbytné odstranit z kultury již přítomné mutantní buňky.

1.4.1.4 *Metabolická aktivace*

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodným systémem metabolické aktivace a bez něho. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (15, 16, 17 a 18), nebo směs fenobarbitonu a β-naftoflavonu (19, 20).

Postmitochondriální frakce je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích 1–10 % obj. Volba a podmínky metabolického aktivačního systému může záviset na třídě zkoušené chemické látky. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce.

▼B

Řada výsledků vývoje, včetně přípravy geneticky modifikovaných buněčných linií exprimujících specifické aktivační enzymy, poskytuje možnosti pro endogenní aktivaci. Volba použitých buněčných linií by měla být vědecky zdůvodněna (např. důležitostí isoenzymu cytochromu P450 pro metabolismus zkoušené látky).

1.4.1.5 *Příprava zkoušené látky*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím buněk a s aktivitou S9. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu. Vodu lze odstranit přidáním molekulového síta.

1.4.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v testovacím systému a změny pH nebo osmolality.

Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez ní v hlavním experimentu za použití vhodných indikátorů buněčné integrity a růstu, jako jsou relativní účinnost klonování (přežití) nebo relativní celkový růst. Může být výhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžném experimentu.

Měly by být použity alespoň čtyři analyzovatelné koncentrace. V případě toxicity by měly tyto koncentrace pokrývat rozmezí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou, což bude obvykle znamenat, že by se koncentrace měly lišit faktorem 2 až √10. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, mělo by být výsledkem přibližně 10–20 % (ale nejméně 10 %) přežití (relativní účinnost klonování) nebo relativní celkový růst. Vpřípadě relativně necytotoxických látek by měla být maximální zkušební koncentrace 5 μl/ml, 5 mg/ml nebo 0,01 M, podle toho, která z nich je nejnižší.

▼B

Relativně nerozpustné látky by měly být zkoušeny až k mezi rozpustnosti za kultivačních podmínek, nebo až za tuto mez. Měla by být stanovena případná nerozpustnost v konečném médiu, ve kterému jsou buňky exponovány. Může být užitečné stanovit rozpustnost na začátku a na konci expozice, neboť koncentrace v testovacím systému se může v průběhu expozice měnit v důsledku přítomnosti buněk, séra S9 atd. Nerozpustnost lze zjistit vizuálně. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

1.4.2.3 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontroly jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Při použití metabolické aktivace by měla být pro pozitivní kontrolu použita chemická látka, která k mutagenní reakci vyžaduje aktivaci.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

Stav metabolické aktivace	Lokus	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Bez vnější metabolické aktivace	HPRT	ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
		1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	TK (malé a velké kolonie)	methyl-methansulfonát	66-27-3	200-625-0
	XPRT	ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
		1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
S vnější metabolickou aktivací	HPRT	3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimethylbenzoanthracen	57-97-6	200-359-5
	TK (malé a velké kolonie)	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	
		benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	*N*-nitrosodimethylamin (pro vysoké úrovně S9))	62-75-9	200-549-8
		benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5

Mohou být použity také jiné referenční látky pro pozitivní kontrolu, např. má-li laboratoř databázi dosavadních údajů o 5-brom-2'-deoxyuridinu (CAS 59-14-3, EINECS 200-415-9), může být tato referenční látka rovněž použita. Pro pozitivní kontrolu by mělo být pokud možno vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy.

▼B

Měly by být použity negativní kontroly tvořené médiem obsahujícím samotné rozpouštědlo nebo vehikulum a zpracované jinak stejným způsobem jako exponované skupiny. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.4.3 **Postup**

1.4.3.1 *Expozice zkoušené látce*

Proliferující buňky by měly být vystaveny zkoušené látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je účinná doba 3 až 6 hodin). Expoziční doba může být prodloužena na jeden nebo více buněčných cyklů.

Pro každou zkušební koncentraci mohou být použity duplicitní kultury nebo jedna exponovaná kultura. Je-li použita jedna kultura, měl by být počet koncentrací zvýšen tak, aby byl zajištěn odpovídající počet kultur pro analýzu (např. alespoň osm analyzovatelných koncentrací). Měly by být použity duplicitní negativní kontrolní kultury (kontrola rozpouštědla).

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (21, 22).

1.4.3.2 *Stanovení přežití, životaschopnosti a četnosti mutací*

Na konci expoziční doby se buňky promyjí a kultivují za účelem stanovení přežití a za účelem umožnění exprese fenotypu mutantu. Se stanovením cytotoxicity prostřednictvím stanovení relativní účinnosti klonování (přežití) nebo relativního celkového růstu kultur se započne obvykle po expoziční době.

Každý lokus má definované minimální časové nároky, aby umožnil přibližně optimální fenotypovou expresi nově indukovaných mutantů (HPRT a XPRT vyžadují alespoň 6 až 8 dnů, TK alespoň dva dny). Buňky jsou kultivovány v médiu se selekčním činidlem (selekčními činidly) a bez něho (bez nich) za účelem stanovení počtu mutantů a klonovací účinnosti. Se stanovením životaschopnosti (použité pro výpočet četnosti mutantů) se započne na konci doby exprese nasazením na misku bez selekčního činidla.

Je-li zkoušená látka pozitivní ve zkoušce L5178Y $TK^{+/-}$, mělo by být provedeno alespoň na jedné ze zkušebních kultur (s nejvyšší pozitivní koncentrací) a na negativních a pozitivních kontrolách rozdělení kultury podle velikosti kolonií. Je-li zkoušená látka ve zkoušce L5178Y $TK^{+/-}$ negativní, mělo by být rozdělení kultury podle velikosti kolonií provedeno na negativních a pozitivních kontrolách. Při studiích za použití $TK6TK^{+/-}$ může být také provedeno rozdělení kultury podle velikosti kolonií.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje by měly zahrnovat stanovení cytotoxicity a životaschopnosti, počtu kolonií a četnosti mutantů pro exponované a kontrolní kultury. V případě pozitivní odpovědi na zkoušku L5178Y $TK^{+/-}$ se kolonie vyšetřují alespoň u jedné koncentrace zkoušené látky (nejvyšší pozitivní koncentrace) a u negativní a pozitivní kontroly za použití kriteria malá kolonie – velká kolonie. Molekulární a cytogenetická povaha jak mutantů tvořících velké kolonie, tak mutantů tvořících malé kolonie byla podrobně zkoumána (23, 24). Ve zkoušce $TK^{+/-}$ jsou kolonie vyšetřovány za použití kriteria kolonie s normálním růstem (velká) a kolonie s pomalým růstem (malá) (25). U mutantních buněk, které utrpěly nejrozsáhlejší genetické poškození, se prodloužily doby zdvojení, a tvoří tedy malé kolonie. Poškození má obvykle rozsah od ztrát celého genu až po karyotypické viditelné chromosomové aberace. Indukce mutantů tvořících malé kolonie se spojuje s chemickými látkami, které indukují silné chromosomové aberace (26). Méně závažně postižené buňky mutantů rostou podobným tempem jako mateřské buňky a tvoří velké kolonie.

Mělo by být udáno přežití (relativní účinnost klonování) nebo relativní celkový růst. Četnost mutantů by měla být vyjádřena jako počet mutantů k počtu přeživších buněk.

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé kultury. Dále by měly být všechny údaje shrnuty ve formě tabulky.

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Negativní výsledky musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech jak pro dvojznačné výsledky, tak pro negativní výsledky. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací a podmínky metabolické aktivace.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst četností mutantů v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst této četnosti. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody. Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

▼B

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* znamenají, že zkoušená látka indukuje v použitých kultivovaných buňkách savců genové mutace. Reprodukovatelná pozitivní závislost odpovědi na koncentraci je velmi významná. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v použitých kultivovaných buňkách savců genové mutace.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— počet buněčných kultur,

— případně počet pasáží,

— případně metody udržování buněčné kultury,

— nepřítomnost mykoplasmat.

Zkušební podmínky:

— odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti, jsou-li k dispozici,

— složení média, případně koncentrace CO_2,

— koncentraci zkoušené látky,

— objem vehikula a přidané zkoušené látky,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— délka expozice,

— případně hustota buněk během expozice,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,

— pozitivní a negativní kontroly,

▼B

— délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),

— selekční činidla,

— kritéria klasifikace zkoušky na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou,

— metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk,

— definice kolonií podle velikosti a typu (případně včetně kriterií pro malé a velké kolonie).

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky srážení,

— údaje o pH a osmolalitě během expozice zkoušené látce, pokud byly stanoveny,

— velikost kolonií, byla-li vyšetřována, alespoň pro negativní a pozitivní kontroly,

— popřípadě předpoklady laboratoře detekovat mutanty tvořící malé kolonie systémem L5178Y $TK^{+/-}$,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— četnost mutantů.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306–1312.

3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467–485.

4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394–403.

▼B

5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121–128.

6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235–239.

7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147–204.

8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225–251.

9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17–36.

10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135–141.

11) Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9–17.

12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133–147.

13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ – $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, s. 239–268.

14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, s. 66–101.

15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365–373.

16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347–364.

▼B

17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61–108.

18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173–215.

19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175–177.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795–801.

23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51–55.

24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^{r}) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161–174.

25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, 89–102.

26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609–614.

▼B

B.18 **ZKOUŠKA NA POŠKOZENÍ A REPARACI DNA – NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA – V SAVČÍCH BUŇKÁCH *IN VITRO***

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Není uvedena.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na neplánovanou syntézu DNA (UDS) umožňuje měřit reparační syntézu DNA po vyštěpení a nahrazení části DNA obsahující oblast poškození indukovaného chemickými nebo fyzikálními faktory. Zkouška je založena na inkorporaci značeného thymidinu (^{3}H-TdR) do DNA savčích buněk, které nejsou v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ^{3}H-TdR je stanovena autoradiograficky nebo kapalinovou scintilační spektrometrií (LSC) DNA exponovaných buněk. Savčí buněčné kultury, pokud ne přímo primární buněčné kultury hepatocytů potkana, se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti vnějšího metabolického aktivačního systému. UDS může být také stanovena *in vivo*.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zkoušené chemické látky a kontroly nebo referenční látky se připraví v kultivačním médiu nebo se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech a poté se pro účely stanovení zředí kultivačním médiem. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivňovat životaschopnost buněk.

Pro stanovení se použijí primární kultury hepatocytů potkana, lidských lymfocytů, nebo zavedených buněčných linií (lidských diploidních fibroblastů).

Buňky se exponují zkoušené chemické látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

Zkušební podmínky

Počet kultur

Pro každý experimentální bod je potřeba nejméně dvou buněčných kultur pro autoradiografii a šesti kultur (nebo méně, jeli to vědecky zdůvodnitelné) pro metodu stanovení UDS pomocí LSC.

▼B

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí souběžné pozitivní a negativní (neexponované a/nebo s vehikulem) kontroly v přítomnosti i v nepřítomnosti metabolického aktivačního systému.

Příkladem pozitivní kontroly pro stanovení s hepatocyty potkana je 7,12-dimethylbenzoanthracen (7,12-DMBA) nebo N-(fluoren-2-yl)acetamid (2-AAF). Příkladem pozitivní kontroly pro zavedené buněčné linie jak pro autoradiografii, tak i pro LSC prováděné bez metabolické aktivace je 4-nitrochinolin-N-oxid (4-NQO); N-nitrosodimethylamin je příkladem chemické látky pro pozitivní kontrolu při použití metabolického aktivačního systému.

Expoziční koncentrace

Použije se několik koncentrací zkoušené látky v rozsahu přiměřeném pro stanovení odezvy. Nejvyšší koncentrace musí vyvolávat cytotoxické účinky. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Buňky

Pro udržování kultur se použijí vhodná kultivační média, koncentrace CO_2, teplota a vlhkost. U zavedených buněčných linií musí být pravidelně kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty.

Metabolická aktivace

U primárních kultur hepatocytů se nepoužívá metabolický aktivační systém. Zavedené buněčné linie a lymfocyty se exponují zkoušené látce za přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

Postup

Příprava kultur

Zavedené buněčné linie se pomnoží ze zásobních kultur (trypsinací nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), naočkují se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubují se při teplotě 37 °C.

Krátkodobé kultury hepatocytů potkana se připravují tak, že se umožní, aby se čerstvě izolované hepatocyty přichytily ve vhodném médiu k povrchu kultivační nádoby.

Kultury lidských lymfocytů se založí vhodnou metodou.

▼B

Expozice kultur zkoušené látce

Primární hepatocyty potkana

Čerstvě izolované hepatocyty potkana se vhodnou dobu exponují zkoušené látce v médiu obsahujícím ^{3}H-TdR. Po ukončení expozice se médium z buněk odstraní, buňky se promyjí, fixují a vysuší. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulze (může být použita také sloupávací fólie), emulze se exponuje, vyvolá, obarví a vyhodnotí.

Zavedené buněčné linie a lymfocyty

Autoradiografické techniky: Buněčné kultury se vhodnou dobu exponují zkoušené látce a poté se vystaví ^{3}H-TdR. Doba expozice je závislá na druhu zkoušené látky, na aktivitě metabolického systému a na typu buněk. K zachycení vrcholu UDS je třeba ^{3}H-TdR přidat současně se zkoušenou látkou nebo několik minut po expozici. Výběr mezi těmito postupy závisí na možné interakci mezi zkoušenou látkou a ^{3}H-TdR. K rozlišení UDS od semikonzervativní replikace DNA se používá médium deficientní na arginin, nízký obsah séra nebo hydroxymočovina v kultivačním médiu, což působí inhibici semikonzervativní replikace DNA.

Stanovení UDS pomocí LSC: Před expozicí zkoušené látce se zablokuje vstup buněk do S-fáze, jak bylo uvedeno výše; buňky se poté exponují zkoušené látce způsobem popsaným pro autoradiografii. Na konci kultivace se DNA extrahuje z buněk a stanoví se celkový obsah DNA a rozsah zabudování ^{3}H-TdR.

Použijí-li se ve výše uvedených metodách lidské lymfocyty, je v nestimulovaných kulturách suprese semikonzervativní replikace DNA zbytečná.

Analýza

Vyhodnocení autoradiografie

Při vyhodnocování UDS v buněčné kultuře se jádra v S-fázi nehodnotí. Pro každou koncentraci se hodnotí nejméně 50 buněk. Preparáty se před hodnocením opatří kódem. V každém preparátu se hodnotí několik náhodně vybraných vzájemně vzdálených polí. Množství zabudovaného ^{3}H-TdR v cytoplazmě se určí v zóně o velikosti tří jader v cytoplazmě každé hodnocené buňky.

Vyhodnocení LSC

Pro stanovení UDS pomocí LSC se použije přiměřený počet kultur pro každou koncentraci a pro kontroly.

▼B

Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

2.1 VYHODNOCENÍ AUTORADIOGRAFIE

Rozsah zabudování ^{3}H-TdR do cytoplazmy a počet zrn nalezených mimo buněčné jádro se zaznamenají odděleně.

Distribuci rozsahu zabudování ^{3}H-TdR do cytoplazmy a počet zrn v jádře lze popsat střední hodnotou, mediánem a modem.

2.2 VYHODNOCENÍ LSC

U LSC se rozsah zabudování ^{3}H-TdR zaznamená v dpm/µg DNA. Distribuci zabudování lze popsat střední hodnotou dpm/µg DNA a směrodatnou odchylkou.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— použité buňky, hustota a počet pasáží v době expozice kultury, počet buněčných kultur,

— metody použité k udržování buněčné kultury, včetně média, teploty a koncentrace CO_2,

— zkoušená látka, vehikulum, koncentrace a zdůvodnění výběru koncentrací pro zkoušku,

— podrobné údaje o metabolickém aktivačním systému,

— plán expozice,

— pozitivní a negativní kontroly,

— použitá autoradiografická technika,

— postupy použité k blokování vstupu buněk do S-fáze,

— postupy použité k extrakci DNA a ke stanovení celkového obsahu DNA u metody LSC,

— vztah dávka/odezva, jeli to možné,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.19 ZKOUŠKA NA VÝMĚNU SESTERSKÝCH CHROMATID *IN VITRO*

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Stanovení výměny sesterských chromatid (SCE) je krátkodobou zkouškou zaměřenou na detekci reciproční výměny DNA mezi dvěma sesterskými chromatidami replikujícího se chromozomu. SCE představuje vzájemnou výměnu produktů replikace DNA v lokusech jevících se jako homogenní. Proces výměny pravděpodobně zahrnuje zlom a opětovné spojení DNA, ačkoliv zatím existuje málo znalostí o molekulárním základu tohoto procesu. Detekce SCE vyžaduje rozdílné značení sesterských chromatid; toho se dosahuje zabudováním bromdeoxyuridinu (BrdU) do chromosomální DNA na dobu dvou buněčných cyklů.

Savčí buňky *in vitro* se exponují zkoušené látce podle potřeby za přítomnosti i nepřítomnosti savčího vnějšího metabolického aktivačního systému a kultivují se po dobu dvou replikačních cyklů v médiu obsahujícím BrdU. Ke konci kultivace se buňky zpracují inhibitorem dělicího vřeténka (např. kolchicinem), aby se akumulovaly buňky v C-metafázi mitózy; kultury se sklidí a připraví se preparáty pro analýzu chromozomů.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 *Příprava*

— Pro stanovení se mohou používat primární kultury (lidské lymfocyty) nebo zavedené buněčné linie (např. ovariální buňky křečka čínského). U buněk musí být pravidelně kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty.

— Použijí se vhodná kultivační média a inkubační podmínky (teplota, kultivační nádoby, koncentrace CO_2 a vlhkost).

— Před exponováním buněk se zkoušené látky rozpustí nebo suspendují v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk nebo rychlost růstu; vliv na četnost SCE se sleduje kontrolou s rozpouštědlem.

▼B

— Buňky se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vnějšího savčího metabolického aktivačního systému. Pokud se použijí buněčné typy s vnitřní metabolickou aktivitou, mělo by být známo, že úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro zkoušenou třídu chemických látek.

1.6.2 *Zkušební podmínky*

Počet kultur

Pro každý experimentální bod se použijí nejméně dvě kultury.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly využívající jak přímo působící chemickou látku, tak látku vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použije kontrola s vehikulem.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

— přímo působící látky:

  — ethyl-methansulfonát,

— nepřímo působící látky:

  — cyklofosfamid.

Podle potřeby se zařadí další pozitivní kontrola ze stejné třídy chemických látek, jako je zkoušená látka.

Expoziční koncentrace

Zkoušejí se nejméně tři dostatečně odstupňované koncentrace zkoušené látky. Nejvyšší koncentrace musí vyvolat významné toxické účinky, avšak zároveň musí umožnit přiměřenou replikaci buněk. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

1.6.3**e** *Postup*

Příprava kultur

Zavedené buněčné linie se pomnoží ze zásobní kultury (např. trypsinací nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), naočkují se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubují se při teplotě 37 °C. Pro jednovrstevné kultury se stanoví takový počet buněk v kultivační nádobě, aby v době sklizně nepřesáhly 50 % konfluenci. Lze také použít suspensní kultury. Lidské lymfocytární kultury se připraví vhodnými postupy z heparinizované krve a inkubují při teplotě 37 °C.

▼B

Expozice

Buňky v exponenciální fázi růstu se vhodnou dobu exponují zkoušené látce; ve většině případů stačí jedna až dvě hodiny, avšak expozice může být v určitých případech prodloužena až na dva úplné buněčné cykly. Buňky, které nemají dostatečnou vnitřní metabolickou aktivitu, musí být exponovány zkoušené chemické látce za přítomnosti i za nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují v přítomnosti BrdU po dva replikační cykly. Je možné rovněž exponovat buňky současně zkoušené látce a BrdU po dobu dvou buněčných cyklů.

Lidské lymfocytární kultury se exponují, dokud jsou v semisynchronizovaném stavu.

Buňky se analyzují v druhém mitotickém dělení po expozici, přičemž se zajistí, aby expozice chemické látce proběhla v nejcitlivějším stádiu buněčného cyklu. Všechny kultury s přidaným BrdU se udržují až do sklizně v temnu nebo za slabého osvětlení žárovkou, aby se minimalizovala fotolýza DNA, ve které je zabudován BrdU.

Sklizeň buněk

Jednu až čtyři hodiny před sklizní buněk se kultury zpracují inhibitorem dělicího vřeténka (např. kolchicinem). Každá kultura se sklidí a samostatně zpracuje pro přípravu preparátů pro analýzu chromosomů.

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů a barvení

Preparáty pro analýzu chromosomů se připraví standardními cytogenetickými technikami. Barvení preparátů ke znázornění SCE lze provést několika technikami (např. fluorescenční metodou plus Giemsa).

Analýza

Počet analyzovaných buněk závisí na spontánní četnosti SCE v kontrole. Obvykle se hodnotí nejméně 25 dobře rozprostřených metafází na kulturu. Preparáty se před analýzou opatří kódem. V lidských lymfocytech se analyzují pouze metafáze s 46 centromerami. U zavedených linií se analyzují pouze metafáze, které se liší o ± 2 centromery od modálního počtu centromer. Je třeba stanovit, zda se za SCE považuje změna v barvení v oblasti centromery. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě. Pro všechny exponované kultury a kontroly se samostatně zaznamená počet SCE pro každou metafázi a počet SCE/chromosom pro každou metafázi.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

▼B

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— použité buňky, metody udržování buněčné kultury,

— zkušební podmínky: složení média, koncentrace CO_2, koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, inkubační teplota, inkubační doba, délka expozice, použitý inhibitor mitózy, jeho koncentrace a délka jeho působení, typ použitého savčího metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly,

— počet kultur na každý experimentální bod,

— podrobné údaje o způsobu přípravy preparátů,

— počet analyzovaných metafází (odděleně pro každou kulturu),

— střední hodnota počtu SCE/buňku a SCE/chromosom (odděleně pro každou kulturu),

— kritéria hodnocení SCE,

— zdůvodnění výběru koncentrací,

— vztah dávka/odezva, jeli to možné,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.20 ZKOUŠKA NA RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví (SLRL) u *Drosophila melanogaster* umožňuje detekci mutací, a to jak bodových mutací, tak i malých delecí v zárodečných buňkách hmyzu. Tato zkouška je zkouškou na přímé mutace vhodnou pro screening v přibližně 800 lokusech chromosomu X; to představuje asi 80 % všech lokusů chromosomu X. Chromosom X představuje přibližně jednu pětinu celého haploidního genomu.

Mutace v chromosomu X *Drosophila melanogaster* se fenotypicky projeví u samců nesoucích mutovaný gen. Když je mutace letální v hemizygotním stavu, lze na její přítomnost usuzovat z absence jednoho ze dvou typů samčích potomků, kteří se obvykle rodí heterozygotní samici. Ve zkoušce na SLRL se tyto skutečnosti využívají prostřednictvím speciálně označených a uspořádaných chromosomů.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zdroje

Mohou být použiti samci dobře definované divoké linie a samice linie Muller-5. Mohou být použity i jiné vhodně značené linie samic s vícenásobnou inversí chromosomu X.

Zkoušená látka

Zkoušené látky se rozpustí ve vodě. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se mohou rozpustit nebo suspendovat ve vhodných vehikulech (např. ve směsi ethanolu a Tween-60 nebo 80) a před aplikací se dále ředí vodou nebo fyziologickým roztokem. Použití dimethylsulfoxidu (DMSO) jako vehikula je třeba se vyhnout.

▼B

Počet zvířat

Citlivost a síla zkoušky se stanoví předem. Četnost spontánních mutací pozorovaná v příslušné kontrolní skupině významně ovlivní počet exponovaných chromosomů, které je třeba analyzovat.

Způsob podávání

Expozice zkoušené látce může být orální, injekční nebo může jít o expozici plynům nebo parám. Při orální aplikaci (zkrmování) se zkoušená látka podává v cukerném roztoku. Podle potřeby lze zkoušenou látku rozpustit v 0,7 % roztoku NaCl a injekčně nastříknout do hrudní nebo břišní dutiny.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Nasadí se negativní kontroly (s vehikulem) a pozitivní kontroly. Jsou-li k dispozici vhodné laboratorní údaje z dřívějších pokusů s kontrolami, není třeba nasazovat žádné souběžné kontroly.

Úrovně expozice

Použijí se tři úrovně expozice. Pro předběžný orientační odhad se použije jedna úroveň expozice rovnající se buď maximální tolerované koncentraci, nebo úrovni vyvolávající známky toxicity. U netoxických látek se použije nejvyšší dosažitelná koncentrace.

Postup

Samci divokého typu (ve stáří 3–5 dnů) se exponují zkoušené látce a jednotlivě jsou připouštěni k více dosud nepřipuštěným samicím z linie Muller-5 nebo z jiné vhodně značené linie (s vícenásobnou inverzí chromosomu X). Samice se vymění za čerstvé dosud nepřipuštěné samice každé dva až tři dny, aby se pokryl celý buněčný cyklus zárodečných buněk. U potomků těchto samic se sleduje letální účinek odpovídající účinkům na zralé spermie, na spermatidy ve středním nebo pozdním stadiu, na časné spermatidy, spermatocyty a spermatogonie v době expozice.

Heterozygotní samice generace F_1 narozené z tohoto křížení se dále kříží jednotlivě (tj. jedna samice/zkumavku) se svými bratry. V generaci F_2 se v každé kultuře zaznamená absence samců divokého typu. Jestliže se v kultuře F_1 rodí samice nesoucí letální mutaci v rodičovském chromosomu X (tj. nejsou nalezeni žádní samci s ovlivněným chromosomem), testují se dcery těchto samic se stejným genotypem, aby se zjistilo, zda se letalita opakuje v příští generaci.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě; uvede se počet hodnocených chromosomů X, počet afertilních samců a počet chromosomů s letální mutací pro každou koncentraci, pro každé období křížení a pro každého exponovaného samce. Zaznamenává se počet klastrů různých velikostí na každého samce. Výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

▼B

Zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami. Nahromadění recesivních letálních mutací vzniklých v jednom samci se zpracuje a zhodnotí vhodným statistickým způsobem.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— zdroje: použité linie nebo kmeny druhu *Drosophila*, věk hmyzu, počet exponovaných samců, počet sterilních samců, počet vzniklých kultur F_2, počet kultur F_2 bez potomků, počet zjištěných chromosomů nesoucích letální mutaci v každém stadiu zárodečných buněk,

— kritéria pro velikost exponovaných skupin,

— podmínky zkoušky: podrobný popis plánu expozice a odběru vzorků, úrovně expozice, údaje o toxicitě, podle potřeby negativní kontroly (s rozpouštědlem) a pozitivní kontroly,

— kritéria hodnocení letálních mutací,

— vztah expozice/účinek, jeli to možné,

— hodnocení údajů,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.21 **ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO***

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Kultury savčích buněk lze použít pro detekci fenotypických změn in vitro indukovaných chemickými látkami spojovanými s maligní transformací *in vivo*. Často používanými buňkami jsou C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, buňky potkanů Fischer a zkouška se opírá o změny buněčné morfologie, tvorbu ložisek nebo změny v uchycení v polotuhém agaru. Méně často se používají systémy detekující ostatní fyziologické či morfologické změny v buňkách po expozici karcinogenním chemickým látkám. Žádný výsledek zkoušky *in vitro* není důkazem karcinogenity. Některé systémy jsou schopny detekovat promotory tumorů. Cytotoxicita se zjistí měřením účinku zkoušeného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (účinnosti klonování) nebo rychlosti růstu kultur. Stanovením cytotoxicity lze zjistit, zda byla expozice zkoušené látce toxikologicky relevantní, nelze ji však použít k určení četnosti transformace ve všech experimentech, protože u některých mohlo dojít k prodloužení inkubace nebo k replatingu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

B u ň k y

Pro různé zkoušky transformace existuje řada použitelných buněčných linií a primárních kultur. Experimentátor musí zajistit, že buňky použité v testu transformace vykazují příslušné fenotypické změny po expozici známým karcinogenům a že zkouška používaná v jeho laboratoři je ověřena a že je dokumentována její validita a spolehlivost.

M é d i u m

Použitá média a experimentální podmínky musí být vhodné pro použitou zkoušku na transformace.

▼B

Zkoušená látka

Před exponováním buněk je možné zkoušené látky rozpustit nebo suspendovat v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk, rychlost růstu nebo výskyt transformace.

Metabolická aktivace

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodnou metabolickou aktivací a bez ní. Pokud se použijí buněčné typy s vnitřní metabolickou aktivitou, mělo by být známo, že úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro zkoušenou třídu chemických látek.

Zkušební podmínky

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly využívající jak přímo působící chemickou látku, tak látku vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použije kontrola s vehikulem.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

— přímo působící látky:

  — ethyl-methansulfonát,

  — propano-3-lakton,

— látky vyžadující metabolickou aktivaci:

  — N-(fluoren-2-yl)acetamid,

  — 4-dimethylaminoazobenzen,

  — 7,12-dimethylbenzoanthracen.

Podle potřeby se zařadí další pozitivní kontrola ze stejné třídy chemických látek, jako je zkoušená látka.

Expoziční koncentrace

Použije se několik koncentrací zkoušené látky. Tyto koncentrace musí vyvolávat toxický účinek závislý na koncentraci, přičemž nejvyšší koncentrace má vést k nízké úrovni přežití buněk a úroveň přežití buněk při nejnižší koncentraci má být přibližně stejná jako u negativní kontroly. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

▼B

Postup

Buňky se exponují dostatečnou dobu v závislosti na použitém zkušebním systému; při delší expozici může být nezbytná opakovaná expozice spojená s výměnou média (a podle potřeby s výměnou čerstvé metabolické aktivační směsi). Buňky, které nemají dostatečnou vnitřní metabolickou aktivitu, musí být exponovány zkoušené chemické látce za přítomnosti i za nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují za vhodných podmínek, aby se mohl projevit sledovaný transformovaný fenotyp; poté se zaznamená výskyt transformace. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě; podle použité zkoušky jimi mohou být např. počet misek, počet misek s transformací nebo počet transformovaných buněk. Podle potřeby se přežití buněk vyjádří v procentech přežití v kontrolní kultuře a četnost transformací se vyjádří jako podíl transformovaných buněk a životaschopných buněk. Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— typ použitých buněk, počet buněčných kultur, metody udržování buněčných kultur,

— zkušební podmínky: koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, doba inkubace, délka a frekvence expozice, hustota buněk během expozice, typ použitého vnějšího metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly, specifikace sledovaného fenotypu, použitý selekční systém (podle potřeby), zdůvodnění výběru koncentrací,

— metody počítání životaschopných a transformovaných buněk,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dominantní letální účinky způsobují embryonální nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici chemické látce dokazuje, že tato látka poškozuje zárodečné tkáně zkušebního druhu. Obecně se má za to, že dominantní letální mutace jsou způsobeny poškozením chromosomů (strukturní a numerické abnormality). Smrt embrya exponované samice může být také výsledkem toxických účinků.

Samci jsou zpravidla exponováni zkoušené látce a páření s neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi. Různá stadia zárodečných buněk mohou být testována odděleně použitím po sobě jdoucích intervalů páření. Nárůst mrtvých implantací na samici v exponované skupině nad počet mrtvých implantací na samici v kontrolní skupině odpovídá postimplantačním ztrátám. Preimplantační ztráty se hodnotí na základě počtu žlutých tělísek nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině. Celková dominantní letalita je součtem preimplantačních a postimplantačních ztrát. Výpočet celkové dominantní letality je založen na porovnání počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině. Snížení počtu implantací v některých intervalech může být způsobeno zánikem buněk (tj. spermatocytů a/nebo spermatogonií).

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zkoušená látka se pokud možno rozpustí nebo suspenduje v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se mohou rozpustit nebo suspendovat ve vhodných vehikulech. Použité vehikulum nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky.

▼B

Zkušební podmínky

Způsob podávání

Zkoušená látka se obvykle podává pouze jednou. Na základě toxikologických informací lze podávat látku opakovaně. Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

Pokusná zvířata

Jako zkušební druh se doporučuje potkan nebo myš. Provede se náhodný výběr zdravých, pohlavně dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Počet a pohlaví

Použije se dostatečný počet exponovaných samců s ohledem na spontánní variabilitu hodnocené biologické charakteristiky. Počet se zvolí s ohledem na předem stanovenou citlivost detekce a statistickou významnost. V typické zkoušce se například volí takový počet samců v každé exponované skupině, aby bylo dosaženo 30–50 březích samic na dobu připouštění.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí souběžné pozitivní a negativní kontroly (neexponované s vehikulem). Jestliže jsou k dispozici přijatelné výsledky pozitivní kontroly z nedávných experimentů provedených v téže laboratoři, mohou být použity namísto souběžných pozitivních kontrol. Látky pro pozitivní kontroly se za účelem prokázání citlivosti zkoušky použijí ve vhodných nízkých dávkách (např. MMS, intraperitoneálně, 10 mg/kg).

Úrovně dávek

Obvykle se použijí tři úrovně dávek. Nejvyšší dávka má u exponovaných zvířat vyvolat známky toxicity nebo snížené fertility. V některých případech může být postačující jedna vysoká dávka.

Limitní zkouška

Netoxické látky se podávají v množství 5 g/kg při jednorázovém podávání nebo v dávce 1 g/kg na den při opakovaném podávání.

Postup

Existuje několik plánů expozice. Nejčastěji se používá jednorázové podávání. Mohou však být použity jiné plány expozice.

Jeden samec je opakovaně křížen s jednou nebo dvěma neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi ve vhodných intervalech po expozici. Samice musí být u samců ponechány nejméně po dobu trvání jednoho estrálního cyklu, nebo dokud nedojde ke spáření prokázanému spermiemi ve vagině nebo přítomností vaginální zátky.

▼B

Počet páření po expozici je dán plánem expozice a musí být dostatečný, aby zahrnul všechna stádia zárodečných buněk po expozici.

Samice se utratí v druhé polovině březosti a obsah dělohy se vyšetří za účelem určení počtu mrtvých a živých implantací. Vaječníky mohou být vyšetřeny k určení počtu žlutých tělísek.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet samců, počet březích samic a počet nezabřezlých samic. Samostatně se uvedou výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice. Pro každou samici se zaznamená týden páření, dávka, kterou obdržel samec, počet živých a mrtvých implantací.

Výpočet celkového dominantního letálního účinku je založen na porovnání počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině. Srovnání poměru mrtvých implantací k živým implantacím v exponované skupině a téhož poměru v kontrolní skupině vypovídá o postimplantačních ztrátách.

Zaznamenávají-li se údaje o časné a pozdní letalitě, musí být v tabulkách jasně odlišeny. Odhadují-li se také preimplantační ztráty, uvedou se. Preimplantační ztráty mohou být vypočítány jako rozdíl mezi počtem žlutých tělísek a počtem implantací nebo jako snížení průměrného počtu implantací na dělohu ve srovnání s kontrolou.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— druh, kmen, věk a hmotnost zvířat, počet zvířat každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,

— zkoušená látka, vehikulum, zkoušené úrovně dávek a důvody jejich výběru, negativní a pozitivní kontroly, údaje o toxicitě,

— způsob podání a plán expozice,

— plán páření,

— metody průkazu spáření,

— doba usmrcení,

— kritéria pro hodnocení dominantních letálních účinků,

— vztah dávka/odezva, jeli to možné,

▼B

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.23 ZKOUŠKA NA CHROMOSOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 483 – Zkouška na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem zkoušky na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* je identifikovat takové látky, které způsobují strukturní chromosomové aberace ve spermatogoniích savců (1, 2, 3, 4, 5). Rozlišují se dva typy strukturních aberací: chromosomové a chromatidové. U většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromosomové aberace se rovněž vyskytují. Tato metoda však není určena ke stanovení numerických aberací a není k tomuto účelu rutinně používána. Chromosomové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka.

Touto zkouškou se stanovují chromosomové změny ve spermatogoniích a předpokládá se tedy, že tato zkouška poskytne předpověď indukce dědičných mutací v germinálních buňkách.

Při této zkoušce jsou rutinně používáni hlodavci. Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují chromosomové aberace při mitose spermatogonií. Jiné cílové buňky nejsou předmětem této zkoušky.

Pro detekci aberací chromatidového typu ve spermatogoniích by mělo být – dříve než dojde ke ztrátě léze – vyšetřeno první mitotické buněčné dělení, které následuje po aplikaci. Další informace z exponovaných spermatogoniálních kmenových buněk lze získat meiotickou chromosomovou analýzou aberací chromosomového typu v diakinese-metafázi I, kdy se exponované buňky stávají spermatocyty.

Tato zkouška *in vivo* je navržena pro vyšetření, zda jsou mutageny somatických buněk aktivní také v germinálních buňkách. Navíc je tato zkouška se spermatogoniemi významná pro posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo* farmakokinetiku a procesy reparace DNA.

Ve varlatech je přítomna řada generací spermatogonií s různou citlivostí na expozici chemické látce. Detekované aberace tedy představují souhrnnou odpověď exponované populace spermatogonií s převládajícími diferencovanými spermatogoniemi. V závislosti na své poloze ve varlatech mohou nebo nemusí být různé generace spermatogonií exponovány celkovému krevnímu oběhu v důsledku fyzikální a fyziologické bariéry Sertoliho buněk a bariéry mezi krevním oběhem a varlaty.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimální odchylkou chromatid.

Numerická aberace: odchylka počtu chromosomů od normální hodnoty u použitého typu buněk.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromosomových sad (*n*) jiný než diploidní (tj. 3*n*, 4*n* atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromosomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromosomální nebo interchromosomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata jsou vhodným způsobem exponována zkoušené látce a po vhodné době po expozici usmrcena. Před usmrcením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemid®). Z germinálních buněk se poté připraví preparáty chromosomů, obarví se a analyzují se chromosomové aberace metafázujících buněk.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířete*

Běžně jsou používáni samci křečka čínského a myši; lze však použít samce jakéhokoli jiného vhodného druhu savce. Použity by měly být běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých pohlavně dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdraví mladí pohlavně dospělí samci se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

▼B

1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých hladinách dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly poskytovat strukturní aberace ve spermatogoniích *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se předpokládá, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí.

Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby byla pozitivní kontrola podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v jejím případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
cyklofosfamid cyklofosfamid monohydrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
cyklohexylamin	108-91-8	203-629-0
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
akrylamid (monomer)	79-06-1	201-173-7
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

V okamžiku každého odběru by měl být proveden odběr u skupiny negativní kontroly, které je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum a která jinak podstupuje stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s chromosomovými aberacemi. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

▼B

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet zvířat**

Každá exponovaná i kontrolní skupina musí zahrnovat alespoň pět analyzovatelných samců.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky by měly být pokud možno podávány jednorázově nebo nadvakrát (tj. při jedné expozici nebo dvou expozicích). Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu. Jiné režimy podávání by měly být vědecky zdůvodněny.

Ve skupině s nejvyšší dávkou by měly být po expozici provedeny dva odběry. Poněvadž kinetika buněčného cyklu může být zkoušenou látkou ovlivněna, provede se jeden časný odběr a jeden pozdější odběr přibližně 24 hodin a 48 hodin po expozici. V případě jiné než nejvyšší dávky by měl být odběr proveden po 24 hodinách nebo po takové době expozice, která odpovídá 1,5 násobku délky buněčného cyklu, pokud není známa jiná vhodnější doba pro detekci účinku (6).

Navíc mohou být odběry provedeny také v jiné době. Například v případě chemických látek, které mohou indukovat opoždění replikace (lagging) chromosomů nebo mohou způsobovat S-nezávislé účinky, může být vhodnější časnější odběr (1).

Vhodnost plánu opakované expozice musí být určena případ od případu. V případě plánu s opakovanou expozicí by měla být zvířata usmrcena 24 hodin (1,5násobek délky cyklu) po poslední expozici. Podle potřeby mohou být prováděny další odběry v jiné době.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myši je tato doba přibližně 3–5 hodin; u křečka čínského je tato doba přibližně 4–5 hodin.

1.5.3 **Dávkování**

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem a kmenem a za stejného režimu expozice, který se použije v hlavní studii (7). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávky. Tyto úrovně dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě.

▼B

Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající ve spermatogoniích některé známky toxicity (např. snížení počtu spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé meiotické metafázi; toto snížení by nemělo překročit 50 %).

1.5.4 **Limitní zkouška**

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nezbytnou. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích stupňují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

1.5.6 **Příprava preparátů pro analýzu chromosomů**

Ihned po usmrcení se z jednoho nebo obou varlat získá buněčná suspenze, hypotonizuje se a fixuje. Poté se nanese na podložní sklíčka a obarví se.

1.5.7 **Analýza**

U každého zvířete by mělo být analyzováno alespoň 100 buněk v dobře rozprostřené metafázi (tj. minimálně 500 metafází na skupinu). Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací. Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Poněvadž při fixaci často dochází ke chromosomálním zlomům nebo ztrátě chromosomů u části metafází, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu odpovídajícímu číslu 2n ± 2.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk se strukturními chromosomovými aberacemi a počet chromosomových aberací na buňku. Pro exponované a kontrolní skupiny by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahrnují se do celkové četnosti aberací.

▼B

Je-li pozorována mitosa a také meiosa, měl by být pro stanovení možných cytotoxických účinků jako míra cytotoxicity stanoven u všech exponovaných zvířat a zvířat sloužících jako negativní kontrola poměr spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé meiotické metafázi, a to v celkovém vzorku 100 dělících se buněk na jedno zvíře. Pokud je sledována pouze mitosa, nejméně v 1 000 buňkách na zvíře by měl být stanoven mitotický index.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst relativního počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s aberacemi pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (8). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v germinálních buňkách testovacího druhu strukturní chromosomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v germinálních buňkách testovacího druhu chromosomové aberace.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do cílové tkáně.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet a stáří zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

▼B

Zkušební podmínky:

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— údaje o přípravě zkoušené látky,

— údaje o podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění dob usmrcení,

— případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,

— metody stanovení toxicity,

— identifikace látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka aplikace,

— metody přípravy preparátů,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— poměr spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé metafázi meiosy,

— typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,

— celkový počet aberací ve skupině,

— počet buněk s aberacemi ve skupině,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole,

— změny ploidie, pokud byly pozorovány.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼B

4. **LITERATURA**

1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, s. 477–484.

2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289–294.

4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207–209.

6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313–318.

7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.24 **SPOT TEST NA MYŠÍCH**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část E.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část E.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Jedná se o zkoušku na myších *in vivo*, při níž jsou vyvíjející se embrya exponována chemickým látkám. Cílovými buňkami u vyvíjejících se embryí jsou melanoblasty a cílovými geny jsou geny kontrolující pigmentaci srsti. Vyvíjející se embrya jsou heterozygotní pro řadu genů ovlivňujících barvu srsti. Mutace nebo ztráta (při různých genetických událostech) dominantní alely v genu melanoblastu je vyjádřena recesivním fenotypem v dceřiných buňkách vytvářejících skvrnu (spot) pozměněné barvy srsti narozené myši. Počet potomků s těmito skvrnami, mutacemi, se zaznamená a jejich četnost se porovná s četností u potomků exponovaných pouze rozpouštědlu. Spot test na myších detekuje předpokládané somatické mutace v embryonálních buňkách.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zkoušené chemické látky se pokud možno rozpustí nebo suspendují v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použité vehikulum nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky.

Pokusná zvířata

Myši kmene T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) se zkříží buď s kmenem HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), nebo s kmenem C57BL (nonagouti, a/a). Mohou být použita i jiná křížení za předpokladu, že budou vznikat nonagouti potomci, např. křížení mezi kmenem NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) a DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d).

▼B

Počet a pohlaví

Použije se dostatečný počet březích samic, aby byl zajištěn dostatečný počet živých potomků pro každou použitou úroveň dávky. Vhodná velikost vzorku závisí na počtu skvrn pozorovaných u exponovaných myší a na rozsahu kontrolních údajů. Negativní výsledky jsou přijatelné pouze tehdy, bylo-li hodnoceno nejméně 300 potomků samic exponovaných nejvyšší dávce.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Měly by být k dispozici souběžné kontrolní údaje od myší exponovaných pouze vehikulu (negativní kontroly). Ke zvýšení citlivosti testu mohou být použity kontrolní údaje z dřívějších pokusů provedených v téže laboratoři za předpokladu, že jsou homogenní. Není-li u zkoušené látky zjištěna mutagenita, měly by být k dispozici údaje z pozitivních kontrol, které byly tímto testem získány v poslední době v téže laboratoři při expozici chemické látce se známou mutagenitou.

Způsob podávání

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce březí myši. Podle potřeby se expozice provede inhalací nebo jiným vhodným způsobem.

Úrovně dávek

Použijí se alespoň dvě úrovně dávek, z nichž jedna vyvolává známky toxicity nebo vede ke zmenšení velikosti vrhu. U netoxických látek se použije maximální dosažitelná koncentrace.

Postup

Zvířata se obvykle exponují pouze jednou v 8., 9., nebo 10. dni březosti, přičemž se za 1. den březosti považuje den, kdy byla zjištěna vaginální zátka. Tyto dny odpovídají 7,25, 8,25 a 9,25 dne po koncepci. Během těchto dnů lze provést postupné expozice.

Analýza

U mláďat se mezi třetím a čtvrtým týdnem po vrhu spočítá a zaznamená počet skvrn. Rozlišují se tři kategorie skvrn:

a) bílé skvrny o průměru 5 mm ve střední ventrální linii, u nichž se předpokládá, že vznikly zánikem buněk (WMVS);

b) žluté skvrny typu agouti vyskytující se v okolí mléčných žláz, genitálií, hrdla, axil, oblasti slabin a uprostřed čela, u nichž se předpokládá, že vznikají v důsledku chybné diferenciace (MDS), a

c) pigmentované a bílé skvrny náhodně rozmístěné v srsti, u nichž se předpokládá, že jsou výsledkem somatických mutací (RS).

▼B

Všechny tři kategorie se zaznamenají, avšak pouze poslední, RS, je geneticky relevantní. Obtíže s odlišením MDS od RS lze vyřešit pozorováním chlupů ve fluorescenčním mikroskopu.

Zaznamenávají se nápadné makroskopické morfologické malformace potomků.

2. **ÚDAJE**

Uvede se celkový počet sledovaných potomků a počet mláďat s jednou nebo více skvrnami vyvolanými podle předpokladu somatickými mutacemi. Údaje získané u kontrolních a exponovaných skupin se porovnávají vhodnými metodami. Uvedou se rovněž údaje vztažené na velikost vrhu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— kmen použitý ke křížení,

— počet březích samic v experimentálních a v kontrolních skupinách,

— průměrná velikost vrhu v experimentálních a v kontrolních skupinách při vrhu a při odstavení,

— úroveň(úrovně) dávky zkoušené chemické látky,

— použité rozpouštědlo,

— den březosti, ve kterém byla podána zkoušená látka,

— způsob podání,

— celkový počet sledovaných potomků a počet potomků s kategoriemi skvrn WMVS, MDS a RS v experimentálních a kontrolních skupinách,

— makroskopické morfologické malformace,

— vztah dávka/odezva u kategorie skvrn RS, je-li to možné,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.25 ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na dědičnou translokaci u myší detekuje strukturní a numerické chromosomové změny v savčích zárodečných buňkách zachycené v první generaci potomků. U pozorovaných chromosomových změn se jedná o reciproční translokace a u samičích potomků o ztráty chromosomu X. Nositelé translokací a samice X0 vykazují sníženou fertilitu, která se využívá pro výběr potomstva F_1 pro cytogenetickou analýzu. Úplná sterilita je způsobena některými typy translokací (autosomální translokací X a translokací typu centromera-telomera). Translokace se analyzují v meiotických buňkách samců ve stadiu diakinézy-metafáze I, tzn. buď u samců generace F_1 nebo samčích potomků samic generace F_1. Samice X0 jsou cytogeneticky identifikovány přítomností pouhých 39 chromosomů v mitózách z kostní dřeně.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zkoušené chemické látky se rozpustí v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky nerozpustné ve vodě se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky. Jestliže bylo pro usnadnění dávkování látky použito rozpouštědlo, nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky.

Způsob podávání

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

Pokusná zvířata

Z důvodu snadnějšího křížení a cytologické verifikace se tyto experimenty provádějí na myších. Nepožaduje se žádný specifický kmen myši. Průměrná velikost vrhu u kmene by však měla být větší než osm potomků a měla by být poměrně stálá.

Používají se zdravá pohlavně dospělá zvířata.

▼B

Počet zvířat

Nezbytný počet zvířat závisí na četnosti spontánních translokací a na minimálním počtu indukovaných translokací požadovaném pro pozitivní výsledek.

Zkouška se obvykle provádí analýzou samců generace F_1. Zkouší se nejméně 500 samců generace F_1 na každou exponovanou skupinu. Jestliže se zahrnou také samice generace F_1, je potřeba 300 samců a 300 samic.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Měly by být k dispozici vhodné kontrolní údaje ze souběžné kontroly a z dřívějších pokusů. Jestliže jsou k dispozici přijatelné výsledky pozitivní kontroly z nedávných experimentů provedených v téže laboratoři, mohou být použity namísto souběžných pozitivních kontrol.

Úrovně dávek

Zkouší se jedna úroveň dávky, obvykle nejvyšší dávka vyvolávající minimální toxické účinky, avšak bez vlivu na reprodukční chování nebo přežití. Pro stanovení vztahu dávka/odezva je třeba dvou dalších, nižších dávek. U netoxických látek se použije maximální dosažitelná koncentrace.

Postup

Expozice a páření

Používají se dva plány expozice. Nejčastěji se volí jedno podání zkoušené látky. Je rovněž možné podávat zkoušenou látku sedm dní v týdnu po 35 dnů. Počet oplodnění po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla analyzována všechna exponovaná buněčná stádia zárodečných buněk. Na konci období páření se samice umístí do oddělených klecí. U každého vrhu se zaznamená datum, velikost vrhu a pohlaví mláďat. Všichni samčí potomci se odstaví a samičí potomci se vyloučí, pokud se nepoužijí v experimentu.

Zjišťování translokačních heterozygotů

Používá se jedna ze dvou možných metod:

— test fertility potomků F_1 a následná verifikace možných nositelů translokací cytogenetickou analýzou,

— cytogenetická analýza všech samců generace F_1 bez předchozího výběru testem fertility.

a) Test fertility

Sníženou fertilitu zvířat v generaci F_1 lze stanovit z velikosti vrhu a/nebo analýzou obsahu dělohy samic.

Kritéria určení běžné a snížené fertility musí být stanovena pro každý použitý kmen myší.

▼B

Pozorování velikosti vrhu: samci generace F_1 určení k testování jsou umístěni samostatně do klecí se samicemi buď ze stejného experimentu, nebo ze stejné kolonie. Klece jsou kontrolovány denně počínaje 18. dnem po spáření. Velikost vrhu a pohlaví generace F_2 se při vrhu zaznamenají a vrh se poté vyloučí. Jestliže jsou testovány samice generace F_1, ponechá se generace F_2 malých vrhů pro další zkoušení. Samice, nositelky translokací, se zjistí cytogenetickou analýzou translokací u jakéhokoliv jejich samčího potomka. Samice X0 se rozpoznají ze změny poměru samců a samic u jejich potomků z 1:1 na 1:2. V následném kroku se normální zvířata generace F_1 vyřadí z dalšího testování, jestliže první vrh generace F_2 dosahuje předem určené normální hodnoty nebo ji překračuje; v opačném případě se pozoruje druhý nebo třetí vrh generace F_2.

Zvířata generace F_1, která po vyhodnocení tří vrhů generace F_2 nemohou být klasifikována jako normální, se dále testují buď analýzou obsahu dělohy, nebo se přímo podrobí cytogenetické analýze.

Analýzy obsahu dělohy: Snížení velikosti vrhu u nositelů translokací je způsobena smrtí embryí, takže vysoký počet mrtvých implantací naznačuje přítomnost translokací u testovaných zvířat. Samci generace F_1 kteří mají být testováni, jsou připouštěni každý ke 2–3 samicím. Oplodnění se zjišťuje denní ranní kontrolou vaginální zátky. Samice se usmrtí po 14–16 dnech a zaznamenají se živé a mrtvé zárodky v jejich děloze.

b) Cytogenetická analýza

Zhotoví se mikroskopické preparáty z varlat usušené na vzduchu. Nosiči translokací se identifikují na základě přítomnosti multivalentních konfigurací ve stádiu diakinézy – metafáze I v primárních spermatocytech. Nález nejméně dvou buněk s multivalentními asociacemi je požadovaným důkazem, že testované zvíře je nositelem translokace.

Jestliže nebyl proveden výběr testem fertility, vyšetří se všichni samci generace F_1 cytogeneticky. U každého samce se mikroskopicky vyšetří nejméně 25 buněk ve stadiu diakinézy – metafáze I. Analýza mitotických metafází ve spermatogoniích nebo v kostní dřeni je nezbytná u samců generace F_1 s malými varlaty a potlačením meiózy před diakinézí, nebo u samic generace F_1 s podezřením na X0. Přítomnost neobvykle dlouhého a/nebo krátkého chromosomu v každé z 10 buněk je důkazem existence částečné samčí translokační sterility (typu centromera-telomera). Některé translokace mezi autosomálními chromosomy a chromozomem X způsobující samčí sterilitu mohou být identifikovány pouze proužkovacími technikami analýzy mitotických chromosomů. Přítomnost 39 chromosomů ve všech 10 mitózách je důkazem, že se jedná o samice X0.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

Pro každý interval páření se zaznamená průměrná velikost vrhu a poměr pohlaví při narození a při odstavení.

▼B

Údaje o fertilitě zvířat generace F_1 musí zahrnovat průměrnou velikost vrhu u všech normálních páření a individuální velikosti vrhů u nositelů translokací generace F_1. U analýzy obsahu dělohy se uvede průměrný počet živých a mrtvých zárodků u normálních páření a individuální počty živých a mrtvých zárodků pro každé páření nositelů translokací generace F_1.

U cytogenetické analýzy diakinéze-metafáze I se pro každého nositele translokací uvede počet typů multivalentních konfigurací a celkový počet buněk.

U sterilních jedinců generace F_1 se uvede počet páření a jejich délka. Uvede se hmotnost varlat a podrobné údaje o cytogenetické analýze.

U samic X0 se uvede průměrná velikost vrhu, poměr pohlaví u generace F_2 a výsledky cytogenetické analýzy.

Pokud byli testem fertility předběžně vybráni možní nositelé translokací generaceF_1, uvede se v tabulkách informace o tom, kolik z nich bylo potvrzeno jako translokační heterozygoti.

Uvedou se údaje z experimentů s negativními a pozitivními kontrolami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— kmen myši, stáří a hmotnost exponovaných zvířat,

— počet rodičovských zvířat každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,

— zkušební podmínky, podrobný popis expozice, úrovně dávek, rozpouštědla, použité schéma páření,

— počet a pohlaví mláďat na samici, počet a pohlaví potomků určených pro analýzu translokací,

— doba a kritéria analýzy translokací,

— počet a podrobný popis nositelů translokací, včetně údajů o březosti a popřípadě o obsahu dělohy,

— popis cytogenetické metody a mikroskopické analýzy, pokud možno s obrázky,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.26 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. METODA

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 408 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu delšího období, zahrnující vývoj po odstavení až do dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnou kumulaci a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Metoda klade dále důraz na neurologické příznaky a naznačuje možné imunologické účinky a účinky na reprodukci. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací. Tato studie by měla umožnit identifikaci chemických látek, které by mohly vyvolat neurotoxické nebo imunologické účinky nebo mít nepříznivý vliv na reprodukční orgány, a může odůvodnit další hlubší zkoumání.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg na kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. Vprůběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky a nebyla vystavena žádným experimentálním zásahům. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.2 **Příprava dávek**

Zkoušená látka se podává sondou nebo v potravě či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulse v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U nevodných vehikul by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.4.3 **Zkušební podmínky**

1.4.3.1 *Pokusná zvířata*

Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myši. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita zvířata stejného kmene a stejného původu.

1.4.3.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Na základě dřívějších poznatků o chemické látce nebo jí blízce příbuzné látce by se mělo zvážit i přidání další satelitní skupiny 10 zvířat (5 zvířat každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po ukončení aplikace mohlo posoudit, zda jsou případné účinky vratné nebo trvalé. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodně stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼B

1.4.3.3 *Úrovně dávek*

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.4.3.4), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující dostupné toxikologické a toxikokinetické údaje o zkoušené látce nebo o příbuzné látce. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než přibližně 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na vstřebávání, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vliv na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.4.3.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podání dávek**

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, aplikuje se zvířatům jen v jediné dávce sondou nebo kanylou. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. s výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích zhoršují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

▼B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná dieta.

1.5.2 **Pozorování**

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodnou dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by měla být pečlivě zaznamenávána, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, poruchy dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (1).

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

Ke konci doby expozice, a v každém případě ne dříve než v jedenáctém týdnu, by mělo být provedeno posouzení reakce na smyslové podněty různého typu (1) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty) (2, 3, 4), změří se síla úchopu (5) a motorická aktivita (6). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

Pozorování funkčních poruch prováděná ke konci studie lze vynechat, pokud jsou údaje o pozorování funkčních poruch dostupná z jiných studií a pokud denní klinická pozorování neprokáží žádné funkční poruchy.

▼B

Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

1.5.2.1 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Příjem potravy by se měl provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně zaznamenat spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

1.5.2.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na konci zkušebního období a při případném odběru krevních vzorků v průběhu zkoušky by měla být provedena následující hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a stanoví se protrombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných každému zvířeti před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky). Podobně jako hematologická vyšetření může být v průběhu zkoušky prováděn odběr vzorků pro klinické biochemické zkoušky. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc nalačno ([1]). Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukosy, celkového cholesterolu, močoviny, dusíku močoviny, kreatininu, celkových proteinů a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa, alkalická fosfatasa, gamaglutamyltranspeptidasa a sorbitoldehydrogenasa). Zahrnout lze také stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin, které může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukosa a krev/krvinky.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené látky ovlivnit určité metabolické funkce, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů nalačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterasy. Účelnost těchto vyšetření se posuzuje podle příslušnosti chemické látky do určitých skupin nebo případ od případu.

([1]) Pro řadu stanovení v séru a plazmě, zejména pro glukosu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně by hladovění přes noc mohlo mít vliv na celkový metabolismus a při podávání v potravě by zasáhlo do pravidelnosti expozice zkoušené látce. Pokud se odebírá krev nalačno, měla by být klinická biochemická vyšetření provedena až po pozorování funkčních poruch v rámci studie.

▼B

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

Pokud nejsou údaje o dosavadních výchozích hodnotách dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem zkoušky; obecně se nedoporučuje tyto údaje získávat před expozicí (7).

1.5.2.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, děloha, vaječníky, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a ponořením), aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myší), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřeně), kůže a oči (jestliže byly při oftalmologických vyšetřeních pozorovány změny). Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.2.4 *Histopatologická vyšetření*

U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

1.5.2.5 *Vyšetření všech makroskopických lézí*

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1 ÚDAJE

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Kromě toho by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka**

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 **Testovací druh:**

— použitý druh a kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 **Zkušební podmínky:**

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o způsobu aplikace zkoušené látky,

— skutečné denní dávky (mg/kg tělesné hmotnosti) a popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě (ppm) na skutečnou dávku,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

2.2.4 **Výsledky:**

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

▼B

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— výsledky oftalmologického vyšetření,

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity (je-li dostupné),

— hematologické vyšetření s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími normálními hodnotami,

— konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů a tělesné hmotnosti,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,

— statistické zpracování číselných výsledků, kde je to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

3. **LITERATURA**

1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233–236.

6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198–201.

▼B

B.27 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. METODA

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 409 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu období rychlého růstu a mladé dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnost akumulace a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Tato zkušební metoda umožňuje zjistit nepříznivé účinky vyvolané chemickou látkou na nehlodavcích a měla by být použita pouze tehdy, pokud:

— účinky pozorované v jiných studiích naznačují potřebu je objasnit nebo charakterizovat na dalším druhu, a to na nehlodavcích, nebo

— toxikokinetické studie naznačují, že použití specifického druhu nehlodavce je nejvhodnější volbou laboratorního zvířete, nebo

— existují jiné specifické důvody, které zdůvodňují použití nehlodavce.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg/kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Obvykle používaným druhem nehlodavce je pes, musí jít o definované plemeno, často se používá beagle. Dále lze použít jiné druhy, např. prase nebo miniprase. Primáti se nedoporučují a jejich použití musí být odůvodněno. Použita by měla být mladá zdravá zvířata a v případě psů by podávání mělo začít nejlépe ve věku 4 až 6 měsíců, nejpozději v devíti měsících. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měl by být v obou studiích použit tentýž živočišný druh a plemeno.

1.4.2 **Příprava zvířat**

Použijí se mladá zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předchozím experimentálním postupům. Trvání aklimatizace závisí na vybraném testovacím druhu a původu zvířat. Doporučuje se nejméně 5 dnů pro psy nebo pro prasata chovaná pro tento účel ve vlastním chovu a nejméně 2 týdny pro zvířata z externích chovných zařízení. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.3 **Příprava dávek**

Zkoušenou látku lze podávat v potravě nebo v pitné vodě, sondou nebo v kapslích. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušeného materiálu.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulse v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. Pro nevodná vehikula by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 8 zvířat (4 samice a 4 samci). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Počet zvířat při zakončení studie musí být dostatečný pro smysluplné vyhodnocení toxických účinků. Na základě dřívějších poznatků o zkoušené chemické látce nebo jí blízce příbuzné látce by mělo být vzato v úvahu zařazení dodatečné satelitní skupiny 8 zvířat (4 zvířata každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou pro účely pozorování vratnosti nebo přetrvávání jakýchkoli toxických účinků v období po expozici. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodně stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼B

1.5.2 **Dávkování**

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.5.3), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo vylučování zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a účinky na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.5.3 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.4 **Podání dávek**

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Zpravidla se udržuje co nejnižší objem. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Aplikuje-li se látka sondou nebo v kapslích, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být podle potřeby upraveno tak, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

1.5.5 **Pozorování**

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodnou dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo, pokud je to možné, provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Příznaky toxicity by měly být pečlivě zaznamenány, včetně doby nástupu, stupně a trvání. Pozorování by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čistění nebo opakovaného kroužení) nebo jakékoli zvláštní chování.

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích související s podáním látky, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

1.5.5.1 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼B

1.5.5.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na začátku studie a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed zkušebního období a na konci zkušebního období se provede hematologické vyšetření, včetně stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a srážlivosti krve, stanoví se protrombinový a trombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům na začátku zkušebního období a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed a na konci zkušebního období. Zkušební oblasti, které je vhodné stanovit jsou koncentrace elektrolytů, metabolismus cukrů a funkce jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek ovlivní pozorování mechanismu účinku zkoušené látky. Před odběrem vzorků by měla být zvířata ponechána nalačno po dobu vhodnou pro daný druh. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glykémie nalačno, alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru.

Analýzy moči za použití časově definovaného sběru by se měly provést alespoň na začátku, uprostřed a na konci studie. Analýzy moči zahrnují vyšetření vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukosy a krve/krvinek. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další analýzy.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání. Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků. Tyto profily je třeba identifikovat pro chemické látky určitých skupin nebo případ od případu.

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

1.5.5.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra se žlučníkem, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, vaječníky, děloha, štítná žláza (s příštítnými tělísky), brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

▼B

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, oči, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, žlučník, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce, aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myší), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřeně) a kůže. Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.5.4 *Histopatologická vyšetření*

Celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání by mělo být provedeno nejméně u všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze.

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1 ÚDAJE

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼B

2.2.1 **Zkoušená látka**

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 **Testovací druh:**

— použitý druh a kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 **Zkušební podmínky:**

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,

— přepočet z koncentrace látky v potravě nebo ve vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti (pokud jde o aplikaci v potravě nebo ve vodě),

— podrobné údaje o potravě a kvalitě vody.

2.2.4 **Výsledky**

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— oftalmologické vyšetření,

— hematologické vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami,

— konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů k tělesné hmotnosti,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,

— popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼B

B.28 **STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 90 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky. V průběhu období aplikace se zvířata každý den pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je obvykle třeba opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou, popřípadě vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1. Pokusná zvířata

Může být použit dospělý potkan, králík nebo morče. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty. Provádíli se subchronická dermální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

▼B

1.6.2.2. Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců) se zdravou kůží. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Kromě toho může být satelitní skupině 20 zvířat (10 zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 90 dnů a 28 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

1.6.2.3. Úrovně dávek

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, jeli použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Používáli se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, jaké obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. V ideálním případě by střední úroveň dávky měla vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použijeli se více než jedna mezilehlá úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolních skupinách by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došloli k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.3. Limitní zkouška

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, jeli známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.4. Doba pozorování

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

▼B

1.6.5. *Postup*

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů.

Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, se pozorují dalších 28 dnů bez aplikace, aby se posoudilo zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; měla by se však porýt co největší část této plochy co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředky pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění se však nedoporučuje.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se známky toxicity včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Měření spotřeby potravy a hmotnosti zvířat se provádějí týdně. Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Na konci zkoušky se všechna zvířata, která přežila, s výjimkou satelitních skupin, pitvají. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provádějí následující vyšetření:

a) oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným vhodným přístrojem se provede před podáním zkoušené látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, alespoň však u skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Jsou-li zjištěny oční změny, vyšetří se všechna zvířata;

b) na konci zkoušky se provede hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erythrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve, změří se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;

▼B

c) na konci zkoušky se provede biochemická analýza krve. Pro tyto studie je vhodné analyzovat koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek bude určen pozorováním způsobu účinku látky. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (délka doby hladovění se volí podle živočišného druhu), hladiny sérové glutamát-pyruvát transaminasy ([1]), glutamát-oxalacetát transaminasy ([2]), ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru. Mezi další stanovení, která mohou být nezbytná pro správné toxikologické hodnocení, patří stanovení lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být použity, je-li nezbytné provést širší vyšetření pozorovaných účinků;

d) analýza moči se běžně nevyžaduje, provádí se pouze na základě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou kontrolní údaje z dřívějších pozorování vhodné, zváží se stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem aplikace.

Pitva

U všech zvířat se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží, aby nedošlo k vysychání. Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými lézemi, mozek – v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/přištítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přídatné pohlavní orgány), (kůže), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, hrudní kost s kostní dření, (oči), (kost stehenní včetně kloubních ploch), (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní) a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se vyšetřují pouze v případě, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

Histopatologická vyšetření

a) Úplné histopatologické vyšetření normální a exponované kůže, orgánů a tkání se provede u všech zvířat kontrolní skupiny a u zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka.

b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.

([1]) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.
([2]) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

▼B

c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.

d) Použijí-li se potkani, plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří k zjištění příznaků infekce, neboť to umožňuje vhodné posouzení zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých byly zjištěny léze ve skupině s vysokou dávkou.

e) V případě použití satelitní skupiny se provede histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,

— zkušební podmínky,

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud je použito) a koncentrace,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,

— úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,

— doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,

— popis toxických nebo jiných účinků,

— doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,

— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,

— provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),

— pitevní nálezy,

▼B

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼M4

B.29 SUBCHRONICKÁ INHALAČNÍ TOXICITA: 90DENNÍ STUDIE

SHRNUTÍ

Tato revidovaná zkušební metoda B.29 byla navržena s cílem plně charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky podávané inhalační cestou při subchronické expozici (90 dnů) a získat průkazné údaje pro kvantitativní posouzení rizik inhalace. Skupiny 10 samců a 10 samic hlodavců se vystaví 6 hodin denně po dobu 90 dnů (13 týdnů) a) zkoušené chemické látce na třech nebo více úrovních koncentrace, b) filtrovanému vzduchu (negativní kontrola) a/nebo c) nosiči (kontrola s nosičem). Zvířata jsou obvykle exponována 5 dnů týdně, avšak expozice po 7 dnů v týdnu je rovněž povolena. Zkouška se vždy provádí se samci i samicemi, avšak mohou být vystaveni odlišným úrovním koncentrace, pokud je známo, že je jedno pohlaví citlivější vůči dané zkušební chemické látce. Tato metoda poskytuje vedoucímu studie možnost zařadit do zkoušky satelitní (reverzibilní) skupiny, předběžná utracení, bronchoalveolární laváž (BAL), neurologické testy a další klinická patologická a histopatologická vyšetření za účelem lepší charakterizace toxicity zkoušené chemické látky.

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení 413 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 413 (TG 413) subchronické inhalační toxicity byly schváleny v roce 1981 (1). Tato zkušební metoda B.29 (odpovídající revidovaným pokynům TG 413 (2009)) byla aktualizována tak, aby odrážela stav vědeckého poznání a naplňovala stávající a budoucí regulační potřeby.

2. Studie subchronické inhalační toxicity se používají především k odvození regulačních koncentrací pro posouzení rizika pro pracovníky v pracovním prostředí. Také se používají k posouzení rizika pro člověka v obytných prostorách, v dopravě a rizika pro životní prostředí. Tato metoda umožňuje charakterizaci nepříznivých účinků po opakované denní inhalační expozici zkoušené chemické látce po dobu 90 dnů (přibližně 10 % délky života potkana). Údaje získané ve studiích subchronické inhalační toxicity lze použít ke kvantitativnímu posouzení rizik a k výběru koncentrací pro chronické studie. Tato zkušební metoda není speciálně určena pro zkoušky nanomateriálů. Definice použité v kontextu této zkušební metody jsou uvedeny na konci této kapitoly a v Pokynech GD 39 (2).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby se zvýšila kvalita studie a minimalizovalo použití zvířat. Mezi informace, které usnadňují výběr vhodných zkušebních koncentrací, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozice člověka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a údaje získané při jiných zkouškách toxicity po opakované expozici. Očekává-li se nebo je-li v průběhu studie pozorována neurotoxicita, může se vedoucí studie rozhodnout zahrnout vhodná vyšetření, například funkční pozorovací baterii (functional observational battery, FOB) a měření motorické aktivity. Přestože načasování expozic s ohledem na konkrétní vyšetření může být velmi důležité, nemělo by provádění těchto doplňkových činností narušovat základní plán studie.

▼M4

4. Roztoky žíravých nebo dráždivých zkoušených chemických látek lze testovat při koncentracích, které povedou k požadovanému stupni toxicity. Další informace naleznete v dokumentu GD 39 (2). Při vystavování zvířat těmto materiálům by však měly být cílové koncentrace dostatečně nízké, aby nezpůsobily výraznou bolest a utrpení, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit případ od případu, nejlépe na základě výsledků vhodně navržené studie ke stanovení dávkování, která poskytuje informace o kritickém cílovém parametru, prahu dráždivosti a době nástupu účinků (viz odstavce 11–13). Mělo by se uvést zdůvodnění výběru dané koncentrace.

5. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo vykazují známky závažného a přetrvávajícího stresu, by se měla humánním způsobem utratit. Umírající zvířata se posuzují stejným způsobem jako zvířata, která při zkoušce uhynou. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů OECD o humánních cílových parametrech (3).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

6. Měli by se použít mladí zdraví dospělí hlodavci běžně používaných laboratorních kmenů. Nejvhodnějším druhem je potkan. Pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

7. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den randomizace by mělo jít o mladé dospělé jedince staré 7 až 9 týdnů. Tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví. Zvířata se náhodně vyberou, označí pro potřeby individuální identifikace a umístí se do klecí nejméně 5 dnů před začátkem zkoušky, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

Zvířecí chov

8. Zvířata by měla být individuálně označena, nejlépe pomocí subkutánních transpondérů, aby se usnadnila pozorování a zamezilo záměně. Teplota zkušební místnosti, v níž se zvířata uchovávají, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na zkumavky omezující pohyb. Zkumavky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo minutový dechový objem. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

▼M4

Inhalační komory

9. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i expozici hlavy, nosu nebo tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

STUDIE TOXICITY

Mezní koncentrace

10. Na rozdíl od akutních studií nejsou ve studiích subchronické inhalační toxicity žádné definované mezní koncentrace. Maximální zkoušená koncentrace by měla zohledňovat: 1) maximální dosažitelnou koncentraci, 2) úroveň expozice člověka v „nejhorším případě“, 3) potřebu udržet dostatečný přívod kyslíku, a/nebo 4) dobré životní podmínky zvířat. Chybí-li mezní hodnoty založené na skutečných údajích, mohou se použít akutní limity z nařízení (ES) č. 1272/2008 (13) (tj. maximálně 5 mg/l pro aerosoly, 20 mg/l pro páry a 20 000 ppm pro plyny), viz GD 39 (2). Pokud je při zkouškách plynů nebo vysoce těkavých chemických látek (např. chladicí prostředky) potřeba tyto limity překročit, mělo by se uvést zdůvodnění. Z mezní koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu bez toho, aby byly zvířata vystavena nadměrnému stresu nebo aby byla ovlivněna délka jejich života.

Studie ke stanovení rozsahu

11. Před zahájením hlavní studie je obvykle nutno provést studii ke stanovení rozsahu. Studie ke stanovení rozsahu je komplexnější než orientační studie, protože není omezená na výběr koncentrace. Poznatky získané ve studii ke stanovení rozsahu mohou vést k úspěšné hlavní studii. Studie k stanovení rozsahu může například poskytnout technické informace týkající se analytických metod, stanovení velikosti částic, odhalení toxických mechanismů, klinické patologie a histopatologických údajů a odhady koncentrací NOAEL a MTC v hlavní studii. Vedoucí studie se může rozhodnout použít studii ke stanovení rozsahu pro určení prahové hodnoty pro podráždění dýchacích cest (např. pomocí histopatologického vyšetření dýchacích cest, zkoušení plicních funkcí nebo bronchoalveolární laváže), horní hranice koncentrace, kterou zvířata snášejí bez nadměrného stresu, a parametry, které budou nejlépe charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky.

12. Studie ke stanovení rozsahu se může skládat z jedné nebo více úrovní koncentrace. V závislosti na zvolených cílových parametrech by se mělo každé úrovni koncentrace vystavit tři až šest samců a tři až šest samic. Studie ke stanovení rozsahu by měla trvat minimálně 5 dní a obvykle ne déle než 28 dní. Ve zprávě o studii by se mělo uvést zdůvodnění výběru koncentrací pro hlavní studii. Cílem hlavní studie je ukázat vztah mezi koncentrací a odezvou založený na předpokládaném nejcitlivějším cílovém parametru. Nízká koncentrace by měla být v ideálním případě koncentrace, při níž nejsou pozorovány nepříznivé účinky, zatímco z vysoké by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu, aniž by se zvířatům způsobil nadměrný stres nebo se ovlivnila délka jejich života (3).

▼M4

13. Při výběru úrovní koncentrace pro studii ke stanovení rozsahu by se měly zvážit veškeré dostupné informace, včetně vztahů mezi strukturou a aktivitou a údajů o podobných chemických látkách (viz odstavec 3). Studie ke stanovení rozsahu může potvrdit/vyvrátit cílové parametry, které se považují z mechanistického hlediska za nejvíce citlivé, např. inhibice cholinesterázy organickými fosfáty, tvorba methemoglobinu v důsledku erytrocytotoxických látek, hormony štítné žlázy (T_3, T_4) u tyreotoxických látek, bílkoviny, LDH nebo neutrofily v bronchoalveolární laváži u neškodných špatně rozpustných částic nebo aerosolů dráždících plíce.

Hlavní studie

14. Hlavní studie subchronické toxicity se obvykle skládá ze tří úrovní koncentrace a rovněž zahrnuje souběžné negativní kontroly (se vzduchem) a/nebo dle potřeby kontroly s nosičem (viz odstavec 18). Při výběru vhodných úrovní expozice je třeba použít veškeré dostupné údaje, včetně výsledků studií systémové toxicity, metabolismu a kinetiky (zvláštní důraz by se měl klást na vyloučení vysokých úrovní koncentrace, které saturují kinetické procesy). Každá experimentální skupina obsahuje alespoň 10 samců a 10 samic hlodavců, kteří jsou vystaveni zkoušené chemické látce 6 hodin denně 5 dnů v týdnu po dobu 13 týdnů (celková doba trvání studie je alespoň 90 dní). Zvířata lze rovněž vystavit látce 7 dní v týdnu (např. při zkouškách inhalačních farmaceutik). Je-li známo, že je jedno pohlaví vůči dané zkoušené chemické látce citlivější, je možné vystavit jednotlivá pohlaví odlišným úrovním koncentrace, aby se optimalizoval vztah mezi koncentrací a odezvou, jak popisuje odstavec 15. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Použije-li se doba expozice kratší než 6 hodin/den, nebo pokud je nutné provést studii celotělové expozice s dlouhou dobou expozice (např. 22 hodin/den), mělo by se uvést zdůvodnění (viz GD 39) (2). Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat, jestliže doba expozice nepřesahuje 6 hodin. Během celotělové expozice je možné zvířatům podávat vodu.

15. Zvolené cílové koncentrace by měly vést k identifikaci cílového orgánu (cílových orgánů) a ukázat jasný vztah mezi koncentrací a odezvou:

— Vysoká úroveň koncentrace by měla mít toxické účinky, avšak neměla by způsobovat trvalé následky či letalitu, které by zabránily smysluplnému vyhodnocení.

— Střední úrovně koncentrací mezi mezními hodnotami by měly odstupňovány, aby se toxické účinky zvyšovaly od nízké po vysokou koncentraci.

— Nízká úroveň koncentrace by měla vyvolat malé nebo žádné příznaky toxicity.

Předběžná utracení

16. Je-li plánováno utracení některých zvířat před ukončením studie, měl by se počet zvířat na každé úrovni expozice zvýšit o počet zvířat určených k utracení před koncem studie. Předběžná utracení by se měla zdůvodnit a náležitě zohlednit ve statistických analýzách.

▼M4

Satelitní studie (reverzibility)

17. Satelitní studii (reverzibility) je možné použít k pozorování reverzibility, přetrvávání nebo opožděného nástupu toxicity během dostatečně dlouhého období po expozici, nejméně však po 14 dnů. Skupiny v satelitní studii (studii reverzibility) tvořené deseti samci a deseti samicemi se látce vystaví současně s pokusnými zvířaty v hlavní studii. Skupiny v satelitní studii (studii reverzibility) by se měly vystavit nejvyšší úrovni koncentrace zkoušené chemické látky a měly by se použít souběžné kontroly se vzduchem a/nebo s nosičem, dle potřeby (viz odstavec 18).

Kontrolní zvířata

18. Se zvířaty v souběžné negativní kontrolní skupině (se vzduchem) by se mělo zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině, místo zkoušené chemické látce se však vystaví filtrovanému vzduchu. Pokud se ke generování zkušební atmosféry používá také voda nebo jiná látka, měla by se do studie místo negativní kontroly se vzduchem zařadit kontrolní skupina s nosičem. Kdykoli je to možné, měla by se jako nosič použít voda. Použije-li se jako nosič voda, měla by se kontrolní zvířata vystavit vzduchu o stejné relativní vlhkosti jako experimentální skupiny. Výběr vhodného nosiče by měl vycházet z vhodně provedené předběžné studie nebo dříve získaných údajů. Není-li toxicita nosiče dostatečně známá, může se vedoucí studie rozhodnout použít jak negativní kontrolu (se vzduchem), tak kontrolu s nosičem, ale takový postup se rozhodně nedoporučuje. Jestliže historické údaje ukážou, že nosič není toxický, není třeba používat negativní kontrolní skupinu (se vzduchem) a měla by se použít pouze kontrolní skupina s nosičem. Jestliže předběžná studie zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a měla by se použít tato kontrola s nosičem.

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

19. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolených koncentracích a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací. Partikulární materiály je možné podrobit mechanickým postupům ke snížení velikosti částic. Další pokyny jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

Distribuce velikosti částic

20. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení velikosti částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 3 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (4). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba předložit odborný posudek. Například částice kovových výparů mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice a vlákna ji mohou překračovat.

▼M4

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

21. V ideálním případě by se měla zkoušená chemická látka testovat bez nosiče. Jestliže je nutné použít nosič k získání vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky, měla by se přednostně použít voda. Kdykoli je zkoušená chemická látka v tomto nosiči rozpuštěna, měla by se prokázat její stabilita.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

22. Proudění vzduchu expoziční komorou by se mělo při každé expozici pečlivě kontrolovat, neustále monitorovat a zaznamenávat nejméně v hodinových intervalech. Aktuální monitorování koncentrace látky ve zkušební atmosféře (nebo stability v čase) je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek ke kontrole všech důležitých dynamických inhalačních parametrů. Monitoruje-li se koncentrace v reálném čase, je možné snížit frekvenci měření průtoku vzduchu komorou na jediné měření pro každou expozici za den. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tomu, aby se zamezilo opětovnému vdechování látky v komorách s nazální cestou expozice. Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit. Jestliže měření v první den expozice ukážou, že jsou úrovně těchto plynů správné, není třeba provádět další měření.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

23. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v dýchací zóně zvířat, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla nepřetržitě sledovat a zaznamenávat pokud možno alespoň v hodinových intervalech během každé expozice. Relativní vlhkost by se měla udržovat nejlépe v rozmezí 30 až 70 %, to však může být neproveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo neměřitelné v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

24. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu, který prošel systémem inhalační komory. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, ale porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít ke zjištění problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

25. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky ve vzorcích odebraných v dýchací zóně zvířat v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složky nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to

▼M4

však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze.

26. Během celé studie by se měla použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za takových podmínek, aby zůstal čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných kontaminujících látek a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie, nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do jisté míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. barvu, fyzikální vlastnosti atp.).

27. Podle možností je třeba udržovat expoziční atmosféru konstantní. K prokázání stability podmínek expozice lze použít přístroj pro sledování v reálném čase, například fotometr pro aerosoly nebo analyzátor celkových uhlovodíků pro páry. Skutečné koncentrace v komoře by se měly měřit alespoň třikrát během každého dne expozice a pro každou úroveň expozice. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, je přípustné použít jeden vzorek pro každé období expozice. V ideálním případě by se měl tento vzorek odebírat po celou dobu expozice. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována. Bere se při tom v úvahu doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}) a doba rozpadu. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (2).

28. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře jinak. Proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná složka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo indikační látky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

29. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla stanovit alespoň jednou týdně pro každou úroveň koncentrace pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic (APS). Je-li možné prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru a jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie.

▼M4

30. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger / plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat u veškerých zkoušených koncentrací jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat studii.

31. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází.

POZOROVÁNÍ

32. Zvířata by se měla klinicky sledovat před expozicí, během expozice i po expozici. Mohou být nutná častější pozorování v závislosti na reakci zvířat během expozice. Je-li pozorování zvířat znemožněno použitím zkumavek omezujících pohyb zvířat, špatným osvětlením v komorách pro celotělovou expozici nebo neprůhlednou atmosférou, měla by se zvířata pečlivě pozorovat po expozici. Pozorováním před expozicí následující den je možné zhodnotit případnou reverzibilitu nebo exacerbaci toxických účinků.

33. Všechna sledování se zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře zvlášť. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

34. Pozorování v kleci by měla zaznamenat změny kůže, srsti, očí, sliznic, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je třeba pozorně sledovat, zde se neobjeví tremor, křeče, slinění, průjmy, letargie, spánek a kóma. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci. Do protokolu studie je možné zahrnout doplňující vyšetření, například kinetiku, biomonitoring, plicní funkce, zadržování špatně rozpustných materiálů, které se hromadí v plicní tkáni a změny v chování.

TĚLESNÉ HMOTNOSTI

35. Tělesná hmotnost jednotlivých zvířat by se měla zaznamenat krátce před první expozicí (den 0), poté dvakrát týdně (například každý pátek a pondělí, aby se prokázalo zotavení po víkendu bez expozice, nebo v takovém časovém intervalu, který umožňuje posouzení systémové toxicity) a v čase uhynutí nebo utracení. Pokud se během prvních 4 týdnů neobjeví žádné účinky na tělesnou hmotnost, lze ji po zbytek studie měřit pouze jednou týdně. Zvířata v satelitní skupině (sledování reverzibility) (jsou-li použita) by se měla nadále vážit jednou týdně po celé období zotavování. Na konci studie by se měla všechna zvířata krátce před utracením zvážit, aby bylo možné provést nezkreslený výpočet podílů hmotnosti orgánů vůči tělesné hmotnosti.

SPOTŘEBA KRMIVA A VODY

36. Spotřeba krmiva by se měla měřit jednou týdně. Rovněž by se měla měřit spotřeba vody.

▼M4

KLINICKÁ PATOLOGIE

37. Klinická patologická vyšetření by se měla provést u všech zvířat, včetně zvířat v kontrolní a satelitní (sledování reverzibility) skupině, když jsou utracena. Měl by se zaznamenat časový interval mezi koncem expozice a odběrem krve, zejména pokud je obnova příslušného cílového parametru rychlá. Odběr vzorků po ukončení expozice je indikován pro parametry s krátkým eliminačním poločasem v plazmě (např. COHb, CHE a MetHb).

38. Tabulka 1 uvádí klinické patologické parametry, které jsou obvykle vyžadovány ve všech toxikologických studiích. Analýza moči se běžně nevyžaduje, může se však provést, pokud se to považuje za vhodné na základě očekávané nebo pozorované toxicity. Vedoucí studie se může rozhodnout vyšetřit další parametry k lepší charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky (např. cholinesteráza, lipidy, hormony, acidobazická rovnováha, methemoglobin nebo Heinzova tělíska, kreatinkináza, poměr myeloidní/erythroidní buňky, troponiny, vyšetření krevních plynů, laktátdehydrogenáza, sorbitoldehydrogenáza, glutamátdehydrogenáza a gamaglutamyltranspeptidáza).

Tabulka 1

Standardní klinické patologické parametry

Hematologická vyšetření	
Počet erytrocytů	Celkový počet leukocytů
Hematokrit	Diferenciální rozpočet leukocytů
Koncentrace hemoglobinu	Počet trombocytů
Průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MHC)	Srážlivost (vyber jednu z možností):
Střední objem erytrocytu (MCV)	— protrombinový čas
Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu	— koagulační čas
Retikulocyty	— parciální tromboplastinový čas
Klinická biochemická vyšetření	
Glukóza (*)	Alaninaminotransferáza
Celkový cholesterol	Aspartátaminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubin	Sodík
Kreatinin	Vápník
Celkový obsah proteinů	Fosfor
Albuminy	Chloridy
Globuliny	
Rozbor moči (volitelný)	
Vzhled (barva a zákal)	Celkový obsah proteinů
Objem	Glukóza
Relativní hustota nebo osmolalita	Krev/krvinky
pH	

(*) Protože dlouhé období lačnění může zkreslit výsledky měření glukózy u exponovaných zvířat oproti zvířatům kontrolním, měl by vedoucí studie určit, zda je vhodné, aby zvířata lačnila. Používá-li se období lačnění, mělo by být vhodné pro daný použitý druh. U potkana to může být 16 h (lačnění přes noc). Stanovení glukózy nalačno lze provést po lačnění přes noc během posledního týdne expozice nebo po lačnění přes noc před pitvou (v tomto případě se provede společně se všemi ostatními klinickými patologickými parametry).

▼M4

39. Existují-li důkazy o tom, že hlavním místem depozice a retence jsou dolní cesty dýchací (tj. alveoly), jako technika pro kvantitativní analýzu hypotetických parametrů závislosti účinku na dávce zaměřená na alveolitidu, plicní zánět a fosfolipidózu, může být zvolena bronchoalveolární laváž (BAL). Umožňuje to vhodně vyšetřit změny ve vztahu dávka–odezva a čas–průběh při poškození plicních sklípků. V tekutině z BAL lze stanovit diferenciální rozpočet leukocytů, celkový obsah proteinů a laktátdehydrogenázu. Další parametry, které je možno zvážit, jsou ty, které svědčí o lysozomálním poškození, fosfolipidóze, fibróze, zánětu z podráždění nebo alergickém zánětu, což může zahrnovat stanovení prozánětlivých cytokinů/chemokinů. Měření v tekutině BAL obecně doplňují výsledky histopatologických vyšetření, avšak nemohou je nahradit. Pokyny, jak provádět laváž plic je možné nalézt v dokumentu GD 39 (2).

OFTALMOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

40. Pomocí oftalmoskopu nebo obdobného přístroje by se mělo provést oftalmologické vyšetření fundu, lomivých prostředí oka, duhovky a spojivek u všech zvířat před podáním zkoušené chemické látky a u všech skupin s vysokou koncentrací látky a u kontrolních skupin také při ukončení studie. Zjistí-li se na očích změny, měla by se vyšetřit také všechna zvířata v ostatních skupinách, včetně satelitní skupiny (sledování reverzibility).

PITVA A HMOTNOSTI ORGÁNŮ

41. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu ohleduplného zacházení se zvířaty, by se měla podrobit úplnému vykrvení (je-li proveditelné) a pitvě. Měl by se zaznamenat doba mezi koncem poslední expozice zvířete a jeho utracením. Není-li možné pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotě dostatečně nízké k minimalizaci autolýzy. Pitva by se měla provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

42. Tabulka 2 uvádí orgány a tkáně, které by se měly během pitvy konzervovat ve vhodném médiu pro histopatologické vyšetření. Uchovávání orgánů a tkání uvedených **[**v závorkách**]** a jakýchkoli dalších orgánů a tkání závisí na rozhodnutí vedoucího studie. Orgány uvedené **tučným** písmem by se měly co nejdříve po vyjmutí z těla zbavit přirostlých tkání a zvážit, dříve než vyschnou. Štítná žláza a nadvarlata by se měly vážit pouze v případě potřeby, neboť artefakty z ořezávání přirostlých tkání mohou bránit histopatologickému vyšetření. Tkáně a orgány by se měly fixovat v 10 % pufrovaném formalínu nebo jiném vhodném fixativu ihned po provedení pitvy, a ne později než 24–48 hodin před ořezáváním přirostlých tkání v závislosti na použitém fixativu.

▼M4

Tabulka 2

Orgány a tkáně, které se během pitvy konzervují

Nadledvinky	Jícen
Aorta	[*Bulbus olfactorius*]
Kostní dřeň (a/nebo čerstvý aspirát)	**Vaječníky**
Mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/mostu)	Slinivka břišní
Slepé střevo	Příštítná tělíska
Tlusté střevo	Periferní nerv (*nervus ischiadicus* nebo *nervus tibialis*, nejlépe blízko svalu)
Dvanáctník	Hypofýza
[**Nadvarlata**]	Prostata
[Oči (sítnice, oční nerv) a oční víčka]	*Rectum*
Femur a kolenní kloub	Slinné žlázy
Žlučník (je-li přítomen)	Semenné váčky
[Harderova žláza]	Kůže
Srdce	Mícha (krční, střední hrudní a bederní)
Ileum	**Slezina**
Jejunum	Sternum
Ledviny	Žaludek
[Slzné žlázy (extraorbitální)]	Zuby
Hrtan (3 úrovně včetně báze *epiglottis*)	**Varlata**
Játra	**Brzlík**
Plíce (všechny laloky v jedné úrovni včetně hlavních bronchů)	**Štítná žláza**
Lymfatické uzliny z oblasti plicního hilu, zejména v případě špatně rozpustných partikulárních zkoušených chemických látek. Pro podrobnější vyšetření a/nebo studie s imunologickým zaměřením lze uvažovat i o dalších lymfatických uzlinách, např. z oblasti mediastina, oblasti cervikální, submandibulární a aurikulární.	[Jazyk]
	Průdušnice (alespoň 2 úrovně zahrnující 1 podélný řez skrz *carinu tracheae* a 1 příčný řez)
	[Močovod]
Lymfatické uzliny (distálně od místa vstupu)	[Močová trubice]
Prsní žlázy (samičí)	Močový měchýř
Sval (stehenní)	**Děloha**
Nosohltanové tkáně (alespoň 4 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat *ductus naso-pharyngeus* a lymfatickou tkáň nosní sliznice (NALT))	Cílové orgány
	Veškeré makroskopicky viditelné léze a masy

▼M4

43. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem při tlaku 20–30 cm vody, aby se zachovala struktura plic (5). U všech laloků by se měly odebrat řezy na jedné úrovni, včetně hlavních bronchů, avšak provádí-li se plicní laváž, měly by se u nevyplachovaného laloku provést řezy na třech úrovních (nikoli sériové řezy).

44. Měly by se vyšetřit alespoň 4 úrovně tkání nosohltanu, z nichž jedna by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* (5), (6), (7), (8), (9), aby bylo možné dostatečně vyšetřit epitel dlaždicový, přechodný (respirační bez řasinek), respirační (řasinkový respirační) a čichový a svodnou lymfatickou tkáň (NALT) (10), (11). Měly by se vyšetřit tři úrovně hrtanu a jedna z těchto úrovní by měla zahrnovat bázi epiglottis (12). Měly by se vyšetřit alespoň dvě úrovně průdušnice zahrnující jeden podélný řez skrz *carinu tracheae* v místě bifurkace a jeden příčný řez.

HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

45. Mělo by se provést histopatologické vyšetření všech orgánů a tkání uvedených v tabulce 2 u kontrolní skupiny a skupiny vystavené vysoké koncentraci látky a u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během studie. Zvláštní pozornost je třeba věnovat dýchacím cestám, cílovým orgánům a makroskopicky viditelným lézím. Orgány a tkáně, na nichž se objevily léze u skupiny zvířat vystavené vysoké koncentraci látky, by se měly vyšetřit ve všech skupinách. Vedoucí studie se může rozhodnout provést histopatologická vyšetření v dalších skupinách, aby se prokázala jasná odezva na koncentraci. V případě použití satelitní skupiny (sledování reverzibility) by se mělo provést histopatologické vyšetření všech tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin. Pokud ve skupině s expozicí vysoké koncentraci látky příliš brzy uhyne velký počet zvířat nebo vzniknou jiné problémy, které by mohly zpochybnit významnost údajů, měla by se histopatologicky vyšetřit nejbližší nižší koncentrace. Měl by se učinit pokus porovnat makroskopicky viditelné změny s mikroskopickými nálezy.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

46. U každého zvířete by se měly uvést údaje o tělesné hmotnosti, spotřebě krmiva, klinické patologické údaje, údaje z pitvy, hmotnosti orgánů a histopatologické nálezy. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy. Všechny výsledky, kvantitativní a incidentální, by se měly vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Lze použít všeobecně uznávanou statistickou metodu. Statistické metody by se měly zvolit během vypracovávání návrhu studie.

Protokol o zkoušce

47. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, délku světelné fáze a druh stravy,

▼M4

— použitý druh/kmen a odůvodnění, pokud se použije jiný druh než potkan. Je možné uvést údaje ze zdroje a historické údaje, pokud se týkají zvířat, která byla exponována za podobných podmínek expozice, chovu a lačnění,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně stravy, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a v případě potřeby fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a registrační číslo CAS (Chemical Abstract Services), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory, včetně objemu a nákresu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení k měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizační systém,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (v případě nazální expozice), umístění zvířat v komoře (v případě celotělová expozice),

— stabilita zkušební atmosféry,

— umístění čidel ke snímání teploty a vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— úprava dodávaného/odsávaného vzduchu,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu na jeden expoziční otvor (v případě nazální expozice) nebo množství zvířat na jednu komoru (v případě celotělové expozice),

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95}),

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

▼M4

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět raději v hmotnostních jednotkách (mg/l, mg/m^3, atd.), než v objemových jednotkách (ppm, ppb atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno s nákresem) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o zařízení použitém k monitorování teploty a vlhkosti v komoře a proudění vzduchu komorou (tj. vývoj kalibrační křivky),

— podrobné údaje o zařízení použitém k odběru vzorků k stanovení koncentrace látky v komoře a distribuce velikosti částic,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— metoda randomizace použitá k rozdělení zvířat do zkoušených a kontrolních skupin,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

▼M4

— tabulka s údaji o tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat,

— tabulka s údaji o spotřebě krmiva,

— tabulka s klinickými patologickými údaji,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků

— zvláštní důraz by se měl klást na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možné splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých ke stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo lokální),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (3),

— měl(y) by se určit cílový (cílové) orgán(y),

— měla by se stanovit hodnota NOAEL a LOAEL.

LITERATURA:

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M4

B.30 STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 452 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 452 byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.30 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (1) (2) (3) (4). Aktualizace této zkušební metody B.30 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.32 této přílohy, Studie karcinogenity, a kapitoly B.33 této přílohy, Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity, aby se získaly další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda je určena ke zkouškám široké škály chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií.

2. Většina studií chronické toxicity se provádí na hlodavcích, a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití pro studie prováděné na nich. Je-li potřeba provést studie na nehlodavcích, lze rovněž použít principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (5), příslušně pozměněné, jak je uvedeno v pokynech OECD, Pokyny č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (6).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích chronické toxicity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v pokynech OECD č. 116 (6).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích chronické toxicity používá nejběžněji. Přestože dlouhodobé studie chronické toxicity zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být k posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Zde uvedená zkušební metoda posouzení a vyhodnocení chronické toxicity při orálním podávání může sloužit jako základ protokolu pro inhalační a/nebo dermální studie pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd., studie je však třeba navrhovat individuálně případ od případu. K dispozici jsou pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek inhalační (6), (7) a dermální cestou (6). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se měla konkrétně použít kapitola B.8 této přílohy (8) a kapitoly B.29 této přílohy (9) a rovněž pokyny OECD ke zkouškám akutní inhalační toxicity (7). V případě, že se zkoušky provádí dermální cestou, je třeba použít kapitolu B.9 této přílohy (10).

▼M4

5. Studie chronické toxicity poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, která může opakovaná expozice po značnou část života použitých druhů představovat. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky, určí cílové orgány a možnost akumulace. Může také poskytnout odhad hodnoty dávky bez pozorovaných nepříznivých účinků, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace chronické toxicity zkoušené chemické látky,

— identifikace cílových orgánů,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— předpověď chronických toxických účinků na úrovních expozice člověka,

— získání údajů ke zkoušení hypotéz ohledně způsobu účinku (6).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie vzít v úvahu při posuzování a hodnocení toxikologických vlastností zkoušené chemické látky veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení potenciálu chronické toxicity a minimalizovala použití zvířat. Mezi informace, které usnadní vytváření plánu studie, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, všechny informace o způsobu účinku, výsledky jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozici u člověka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích toxicity po opakované expozici. Stanovení chronické toxicity by se mělo provádět pouze poté, co byly získány úvodní informace o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity po opakované dávce. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách chronické toxicity (11), (12), (13), (14).

8. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci vztahující se k přežití zvířat a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (15).

▼M4

9. Při provádění studie chronické toxicity je nutné řídit se vždy vůdčími principy a úvahami uvedenými v Pokynech OECD č. 19 o rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (16), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí pokračovat ve zkoušce na zvířeti, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

10. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity uvádí Pokyny č. 116 (6) a rovněž dvě publikace ústavu International Life Sciences Institute (17), (18). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na jedné straně a charakterizací odezev na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v situaci, kdy je nutno provést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) (odstavec 11).

11. Mělo by se uvážit, zda neprovést raději kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) nežli jen dvě samostatné studie – chronické toxicity (tato zkušební metoda B.30) a karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů v porovnání s prováděním dvou samostatných studií, a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 9 a 20–25) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie.

12. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (6).

PODSTATA ZKOUŠKY

13. Zkoušená chemická látka se podává denně v postupně rostoucích dávkách několika skupinám pokusných zvířat po dobu 12 měsíců, avšak je možné zvolit i delší nebo kratší dobu expozice v závislosti na regulačních požadavcích (viz odstavec 33). Tato doba trvání by se měla zvolit dostatečně dlouhá na to, aby umožnila manifestaci jakýchkoli účinků kumulativní toxicity, bez zkreslujících příznaků geriatrických změn. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orální cestou, avšak zkoušky prováděné inhalační nebo dermální cestou mohou být také vhodné. Plán studie může rovněž zahrnovat jedno nebo více předběžných utracení, např. za 3 a 6 měsíců, a je možné přidat další skupiny zvířat, aby se tato skutečnost kompenzovala (viz odstavec 19). V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

▼M4

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

14. Tato zkušební metoda primárně zahrnuje posouzení a vyhodnocení chronické toxicity u hlodavců (viz odstavec 2), avšak uznává se, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány podobné studie u nehlodavců. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Plán a provedení studií chronické toxicity u nehlodavců, jsou-li požadovány, by měl vycházet z principů uvedených v této zkušební metodě spolu s principy v kapitole B.27 této přílohy, 90denní studie orální toxicity po opakované aplikaci na nehlodavcích (5). Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6).

15. V této zkušební metodě se dává přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Studie chronické toxicity by se měla provádět na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v předběžných studiích toxicity s kratší dobou trvání. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

Podmínky chovu a krmení

16. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze tehdy, je-li to vědecky odůvodněné (19), (20), (21). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí ve stravě zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů, perzistentní organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měla poskytnout analýza pitné vody. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

17. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť.

▼M4

Zvířata by měla být rozdělena náhodným výběrem do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

18. Měla by se použít obě pohlaví. Mělo by se použít dostatečné množství zvířat, aby bylo na konci studie v každé skupině dost zvířat pro podrobné biologické a statistické vyhodnocení. U hlodavců by se mělo obvykle použít alespoň 20 zvířat od každého pohlaví pro každou skupinu při každé úrovni dávky, oproti tomu u nehlodavců se doporučuje použít minimálně 4 jedince od každého pohlaví pro každou skupinu. Ve studiích používajících myši může být nutné přidat další zvířata do každé skupiny s příslušnou dávkou, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická vyšetření.

Zajištění předběžných utracení, satelitních skupin a ověřovacích zvířat

19. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení (alespoň 10 zvířat/pohlaví/skupinu) např. v 6. měsíci, aby se získaly informace o progresi toxikologických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Rovněž je možné zařadit do studie satelitní skupiny k monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoumanou chemickou látkou; ty budou obvykle omezeny na nejvyšší úroveň dávky ve studii plus kontrolu. Také je možné zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (22). Pokud se plánují předběžná utracení zvířat nebo začlenění satelitní nebo ověřovací skupiny, je nutno zvýšit počet zvířat zařazených do studie o počet zvířat, která budou utracena před ukončením studie. U těchto zvířat by se měly obvykle sledovat stejné parametry, zahrnující tělesnou hmotnost, spotřebu krmiva/vody, hematologická a klinická biochemická měření a patologická vyšetření, jako u zvířat ve fázi chronické toxicity v hlavní studii, avšak měření se také mohou omezit (ve skupinách určených k předběžnému utracení) na konkrétní klíčové parametry, jako je neurotoxicita a imunotoxicita.

Dávkové skupiny a dávkování

20. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6). S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz odstavec 27), by se měly použít nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

▼M4

21. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se obvykle zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Za současného zohlednění faktorů uvedených v odstavci 22 níže by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %).

22. Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možné zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka prokazující toxicitu, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost. Nejvyšší dávka by neměla přesáhnout 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den (mezní dávka, viz odstavec 27).

23. Je možné zvolit úrovně dávek a jejich odstupňování ke stanovení vztahu mezi dávkou a odezvou a NOAEL nebo jiných plánovaných výsledků studie, např. BMD (viz odstavec 25) na nejnižší úrovni dávky. Faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, zahrnují předpokládanou směrnici křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při kterých mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo způsobu toxického účinku, kde se předpokládá prahová hodnota nebo kde se předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek.

24. Odstupňování úrovní dávek bude záviset na vlastnostech zkoušené chemické látky a není možné je v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení sestupných úrovní dávek a často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi dlouhých intervalů (např. více než faktor přibližně 6–10) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití faktorů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

25. Jak je dále uvedeno v Pokynech č. 116 (6), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka.

▼M4

26. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy a posloužila jako vhodnější kontrola.

27. Pokud je možné na základě informací z předběžných studií předpokládat, že zkouška provedená podle postupů popsaných pro tuto studii při jedné úrovni dávky nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den pravděpodobně nevyvolá nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o strukturně příbuzných chemických látkách nepředpokládá toxicita, nemusí být úplná studie s použitím tří úrovní dávek nutná. Mezní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den se může použít s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

28. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě nebo žaludeční sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

29. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Je třeba podle potřeby zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

30. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle neměla přesáhnout horní mez 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti) vypočítané jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

31. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu), obvykle po dobu 12 měsíců (viz také odstavec 33), avšak může být nutná i delší doba v závislosti na regulačních požadavcích. Jakýkoli jiný režim podávání, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (10) po dobu 12 měsíců. Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 12 měsíců. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (8).

32. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možné denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (22). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

33. Přestože je tato zkušební metoda primárně navržena jako 12měsíční studie chronické toxicity, uspořádání studie dovoluje i jiné intervaly, a lze je tedy použít rovněž u kratších (např. 6 nebo 9 měsíců) nebo delších (např. 18 nebo 24 měsíců) studií v závislosti na požadavcích konkrétních regulačních rámců nebo pro specifické mechanistické účely. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Satelitní skupiny zahrnuté pro monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou by se měly udržovat bez podávání látky po dobu nepřekračující 4 týdny a ne delší než jedna třetina celkové délky studie po skončení expozice. Další pokyny, včetně posouzení přežití ve studii, jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6).

POZOROVÁNÍ

34. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaných maximálních účinků po podání látky v případě podání sondou.

▼M4

35. Před první expozicí látce (za účelem intraindividuálního porovnání), na konci prvního týdne studie a dále jednou měsíčně se by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat. Protokol pozorování by se měl uspořádat tak, aby byly odchylky mezi jednotlivými pozorovateli minimalizovány a byly nezávislé na experimentální skupině. Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by se mělo mimo jiné soustředit na změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (24).

36. Před prvním podáním zkoušené chemické látky by se mělo u všech zvířat provést oftalmologické vyšetření s použitím oftalmoskopu nebo jiného vhodného přístroje. Na konci studie by se toto vyšetření mělo provést nejlépe u všech zvířat, avšak minimálně ve skupinách s vysokou dávkou a kontrolních skupinách. Zjistí-li se na očích změny související s podáním látky, měla by se vyšetřit všechna zvířata. Pokud analýza struktury nebo jiné informace naznačují toxicitu pro oko, měla by se četnost provádění očního vyšetření zvýšit.

37. V případě chemických látek, které při předchozích 28denních a/nebo 90denních zkouškách toxicity po opakované dávce vyvolaly neurotoxické účinky, je možné volitelně vyšetřit senzorickou reaktivitu na různé druhy stimulů (24) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní stimuly) (25), (26), (27), sílu úchopu (28) a motorickou aktivitu (29) před zahájením studie a v tříměsíčních intervalech po začátku studie až do 12 měsíců včetně a rovněž při ukončení studie (je-li delší než 12 měsíců). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

38. V případě chemických látek, které při předchozích 28denních a/nebo 90denních zkouškách toxicity po opakované dávce vyvolaly imunotoxické účinky, je možno na konci studie volitelně provést další vyšetření tohoto cílového parametru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

39. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼M4

Hematologická a klinická biochemická vyšetření

40. Ve studiích na hlodavcích by se měla hematologická vyšetření provádět alespoň u 10 samců a 10 samic v každé skupině, 3., 6. a 12. měsíc a rovněž na konci studie (trvá-li déle než 12 měsíců), vždy u stejných zvířat. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická stanovení (viz odstavec 18). Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech) v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření po třech měsících, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na hematologické parametry. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii.

41. Měly by se vyšetřit následující parametry (30): Celkový počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů, počet erytrocytů, trombocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokrit (objem erytrocytů), střední objem erytrocytu (MCV), průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH), průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Dle potřeby lze změřit také další hematologické parametry, jako jsou Heinzova tělíska či jiné atypické morfologické formy erytrocytu nebo methemoglobin, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově by se mělo postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky. Jestliže má zkoušená chemická látka účinek na systém krvetvorby, může být indikováno také vyšetření počtu retikulocytů a cytologie kostní dřeni, přestože se tato vyšetření nemusí provádět rutinně.

42. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných alespoň 10 samcům a 10 samicím v každé skupině ve stejných časových intervalech stanovených pro hematologická vyšetření a s použitím vždy stejných zvířat. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná biochemická vyšetření. Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. ve studiích na psech 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině) v průběžných odběrových časech a na konci studie tak, jak je popsáno u hlodavců. Měření po třech měsících, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na klinické biochemické parametry. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata (s výjimkou myší) přes noc lačnit. Měly by se vyšetřit následující parametry (30): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinin, celkový obsah proteinů, albuminy, vápník, sodík, draslík, celkový cholesterol, alespoň dva vhodné testy pro hepatocelulární vyšetření (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, glutamátdehydrogenáza, celkové kyseliny žlučové) (31) a alespoň dva vhodné testy pro hepatobiliární vyšetření (alkalická fosfatáza, gamaglutamyltransferáza, 5'-nukleotidáza, celkový bilirubin, celkový obsah žlučových kyselin) (31). Dle potřeby je možné změřit také další klinické biochemické parametry, např. triglyceridy nalačno, specifické hormony a cholinesterázu, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově je třeba postup přizpůsobit pozorovanému a/nebo očekávanému účinku zkoušené chemické látky.

▼M4

43. Rozbor moči by se měl provést alespoň u 10 samců a 10 samic v každé skupině, s použitím vzorků odebraných ve stejných intervalech, jako u hematologických a klinických biochemických vyšetření. Měření v 3. měsíci se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na složení moči. Odborné doporučení pro klinické patologické studie zahrnovalo následující parametry (30): vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, celkový obsah proteinů a glukóza. Další stanovení zahrnují ketony, urobilinogen, bilirubin, a okultní krvácení. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další parametry.

44. Obecně se má za to, že ve studiích na psech je třeba před expozicí změřit výchozí hematologické a klinické biochemické parametry, avšak ve studiích na hlodavcích se stanovovat nemusí (30). Pokud jsou však historické výchozí údaje (viz odstavec 50) nedostatečné, je třeba zvážit získání těchto údajů.

Patologie

Pitva

45. U všech zvířat zařazených do studie se obvykle provede celková podrobná pitva zahrnující pečlivé vyšetření povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Nicméně je také možno měření omezit na konkrétní klíčové parametry (ve skupině pro předběžná utracení nebo v satelitní skupině), jako je neurotoxicita či imunotoxicita (viz odstavec 19). Zvířata se nemusí pitvat ani se u nich neprovádí postupy popsané v následujících odstavcích. V jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie může být třeba provést pitvu u ověřovacích zvířat.

46. U všech ostatních zvířat, kromě zvířat vyloučených v druhé části odstavce 45, by se měly zvážit orgány. Nadledvinky, mozek, nadvarlata, srdce, ledviny, játra, vaječníky, slezina, varlata, štítná žláza (vážená po fixaci, včetně příštítných tělísek) a děloha všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by se měly zbavit všech přirostlých tkání a co nejdříve po vyjmutí z těla ve vlhkém stavu zvážit, než vyschnou. Ve studii používající myši je vážení nadledvinek volitelné.

47. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (32) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	rektum	[jazyk]

▼M4

koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou aplikace by se měl zachovat seznam orgánů stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními uvedenými v kapitole B.8 této přílohy (8) a kapitole B.29 této přílohy (9). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

48. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (32). Histopatologická vyšetření by měla minimálně obsahovat:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně ze zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality,

— cílové tkáně nebo tkáně, které vykazují změny v souvislosti s expozicí ve skupině s vysokou dávkou, u všech zvířat ve všech ostatních experimentálních skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

49. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u spojitých dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

50. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenné historické kontrolní údaje, např. v případě, kdy existují známky toho, že se současné kontroly značně odchylují od posledních údajů získaných od kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historické kontrolní údaje, pokud se hodnotí, by měly být ze stejné laboratoře a měly by pocházet od zvířat stejného věku a ze stejného kmene během pěti let předcházejících příslušné studii.

51. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a údaje, které se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 8). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

Protokol o zkoušce

52. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální vlastnosti, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

▼M4

— zdroj, podmínky chovu, krmivo atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata):

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny a případně spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— povaha, výskyt (plus závažnost, je-li hodnocena) a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé),

— oftalmologické vyšetření,

— hematologické testy,

— klinické biochemické testy,

— rozbor moči,

— výsledky všech vyšetření neurotoxicity nebo imunotoxicity,

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů (a jejich poměry, pokud se stanovují),

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné.

▼M4

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující:

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— posouzení všech informací o způsobu účinku,

— diskuse o všech modelovacích přístupech,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— historické kontrolní údaje,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

5) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní studie.

9) Kapitola B.29 této přílohy, Studie subchronické inhalační toxicity: 90denní studie.

10) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely, Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

31) Dokument (návrh) agentury EMEA „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼B

B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 414 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení vývojové toxicity je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinku prenatální expozice na březí pokusné zvíře a na organismus vyvíjející se v děloze; tyto informace mohou zahrnovat jak hodnocení účinku na matku, tak i vliv na uhynutí, strukturální odchylky nebo změněný růst plodu. I když funkční poruchy tvoří významnou část vývoje, nejsou součástí této metody. Zkoušky na tyto poruchy mohou být prováděny v samostatné studii nebo jako doplněk této studie pomocí zkušební metody vývojové neurotoxicity. Informace o zkoušení funkčních poruch a jiných postnatálních účinků lze v případě potřeby získat z dvougenerační zkoušky toxicity pro reprodukci a zkoušky vývojové neurotoxicity.

Tato zkušební metoda může ve specifických případech vyžadovat určitou úpravu na základě specifických znalostí, např. fyzikálněchemických nebo toxikologických vlastností zkoušené látky. Tato úprava je přijatelná, jestliže přesvědčivé vědecké důkazy svědčí o tom, že díky ní bude mít zkouška vyšší vypovídací hodnotou. V takovém případě je třeba tyto vědecké důkazy pečlivě zdokumentovat ve zprávě o studii.

1.2 DEFINICE

Vývojová toxikologie: studie nepříznivých účinků na vyvíjející se organismus, které mohou vyplývat z expozice před početím, během prenatálního vývoje nebo v postnatálním období až do doby pohlavní zralosti. Hlavní projevy vývojové toxicity zahrnují: 1) úhyn organismu, 2) strukturální odchylky, 3) změněný růst a 4) funkční poruchu. Vývojová toxikologie se původně nazývala teratologie.

Nepříznivý účinek: jakákoliv odchylka od normálního stavu spojená se zkouškou, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí. Pokud jde o vývojovou toxikologii v nejširším slova smyslu, zahrnuje tento pojem jakýkoliv účinek, který brání normálnímu vývoji plodu, a to jak před narozením, tak i po něm.

Změněný růst: změna hmotnosti nebo velikosti orgánu nebo těla u potomstva.

Odchylky (anomálie): strukturální změny ve vývoji, které zahrnují jak malformace, tak i odchylky (28).

Malformace/velká odchylka: strukturální změna považovaná za škodlivou pro zvíře (může být i letální); obvykle je vzácná.

▼B

Malformace/malá odchylka: strukturální změna, která nemá žádný nebo má jen malý škodlivý účinek na zvíře; může být přechodná a u kontrolní populace se může vyskytovat poměrně často.

Zárodek: celkové množství derivátů oplodněného vajíčka v jakékoliv fázi vývoje od oplodnění až do narození, včetně dalších zárodečných membrán, embrya nebo plodu.

Implantace (nidace): přichycení blastocytu k epitelové výstelce dělohy, včetně její penetrace do děložního epitelu a zahnízdění v děložní sliznici.

Embryo: raná nebo vývojová fáze organismu, a to zvláště plod vyvíjející se po oplodnění vajíčka poté, co se objeví dlouhá osa a dokud nejsou přítomné všechny hlavní struktury.

Embryotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost embrya.

Zárodek: nenarozený potomek v post-embryonálním období.

Fetotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost plodu.

Potrat: předčasné vyloučení produktů oplodnění – embrya nebo plodu neschopného života – z dělohy.

Resorpce: zárodek, který po implantaci do dělohy později odumřel a vstřebává se nebo se již vstřebal.

Raná resorpce: důkaz o zahnízdění (implantaci) bez rozeznatelného embrya/plodu.

Pozdní resorpce: mrtvé embryo nebo plod se zevními degenerativními změnami.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Obvykle se zkoušená látka podává březím zvířatům nejpozději od implantace až do dne před plánovaným usmrcením, který by se měl co nejvíce přiblížit očekávanému dni vrhu, aniž se riskuje ztráta údajů v důsledku předčasného vrhu. Zkušební metoda není určena výhradně ke zkoumání období organogeneze (např. 5.–15. den u hlodavce a 6.–18. den u králíka), ale popřípadě rovněž ke zkoumání účinků před implantací, pro celé období gestace a až do dne před císařským řezem. Krátce před císařským řezem se samice usmrtí, prozkoumá se děložní obsah a u plodů se vyhodnotí zevní viditelné anomálie, změny měkkých tkání a skeletu.

▼B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Výběr živočišných druhů**

Doporučuje se provádět zkoušení s nejvhodnějšími druhy a využívat laboratorní druhy a kmeny, které se běžně používají při zkoušení prenatální vývojové toxicity. Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan a upřednostňovaným druhem nehlodavce je králík. Použití jiného druhu je třeba odůvodnit.

1.5.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3°) pro hlodavce 18 °C (± 3°) pro králíky, relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

Páření by mělo probíhat v klecích vhodných k tomuto účelu. I když se dává přednost individuálnímu chovu spářených zvířat, přípustný je rovněž chov v malých skupinkách.

1.5.3 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech testovaných skupin stejnou hmotnost a věk. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které by měly být nullipary. Samice se spáří se samci stejného druhu a kmene a nemělo by docházet k páření sourozenců. U hlodavců je nultým dnem gestace den, kdy se pozoruje vaginální zátka a/nebo sperma; u králíků je dnem 0 obvykle den páření nebo umělé inseminace, pokud se tato metoda používá. Oplodněné samice se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přidělí vlastní identifikační číslo. Náhodným výběrem se oplodněné samice rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin, a jsou-li samice pářeny v sadách, rozdělí se zvířata z jednotlivých sad rovnoměrně do všech skupin. Stejně tak se do všech skupin rozdělí samice oplodněné stejným samcem.

1.6 POSTUP

1.6.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá experimentální a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet samic, abych se při pitvě získalo přibližně 20 samic s implantací plodu. Skupiny s méně než 16 zvířaty s implantací plodu nejsou vhodné. Mortalita samic nemusí nutně znamenat znehodnocení studie za předpokladu, že nepřekročí přibližně 10 %.

▼B

1.6.2 **Příprava dávek**

Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující typické znaky: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus a retenci nebo vylučování zkoušené látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené látky, která může pozměnit svoje toxické znaky, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo nutričního stavu zvířat. Vehikulum by nemělo být ani vývojově toxické, ani by nemělo mít vliv na rozmnožování.

1.6.3 **Dávkování**

Zkoušená látka se obvykle podává denně od implantace (např. pátý den po spáření) až do dne před plánovaným císařským řezem. Pokud z případných předběžných studií nevyplývá vysoký potenciál předimplantační ztráty, lze aplikaci prodloužit tak, aby zahrnovala celé období gestace, od spáření až do dne před plánovaným usmrcením. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres během březosti může vést k prenatální ztrátě. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nejsou spojeny s expozicí, je nutné zamezit jak nadbytečné manipulaci se zvířaty, tak i stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. hluk.

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Zdravá zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení fyzickou/chemickou podstatou nebo biologickými vlastnostmi zkoušené látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou vývojovou toxicitu a/nebo toxicitu pro matku (klinické znaky nebo snížení tělesné hmotnosti), ale nikoliv uhynutí nebo značné utrpení. Alespoň jedna střední úroveň dávky by měla vyvolat minimální zjistitelné toxické účinky. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádnou prokazatelnou toxicitu pro matku ani vývojovou toxicitu. S ohledem na prokázání jakékoli reakce související s dávkováním a s úrovní dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) by se měla zvolit sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté exponované skupiny než používání velkých intervalů mezi dávkami (např. lišících se faktorem 10). Ačkoliv je cílem stanovit hodnotu NOAEL pro samici, přijatelné jsou rovněž studie, které tuto hodnotu nestanoví (1).

Při výběru úrovní dávek je třeba brát v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě a také jako další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené látky nebo látek příbuzných. Tyto informace pomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

Použije se souběžná kontrolní skupina. Tato skupina by měla tvořit zdánlivě léčenou kontrolní skupinu nebo kontrolní skupinu s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené látky používá. Všem skupinám se podává stejné množství zkoušené látky nebo vehikula. Se zvířaty v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Kontrolní skupina s vehikulem by měla dostat vehikulum v nejvyšším používaném množství (jako u experimentální skupiny s nejnižší dávkou).

▼B

1.6.4 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška na jedné úrovni dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den při orálním podávání nevyvolá při použití postupů předepsaných pro tuto studii žádnou zjistitelnou toxicitu ani u březích zvířat, ani u jejich plodů, a pokud se neočekává účinek ani na základě existujících údajů (např. o sloučeninách s podobnou strukturou a/nebo metabolismem), není nutné uvažovat o kompletní studii využívající tří úrovní dávek. Je možné, že předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky (např. kožní aplikace by neměla způsobit závažnou lokální toxicitu).

1.6.5 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka nebo vehikulum se obvykle podává orálně intubací. Pokud se používá jiný způsob aplikace látky, měl by experimentátor volbu zdůvodnit a objasnit, přičemž možná bude nutné provést odpovídající změny (2, 3, 4). Zkoušená látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

Dávka pro jednotlivá zvířata obvykle vychází z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Je však nutné věnovat velkou pozornost úpravě dávky během posledního trimestru březosti. Dávka by se měla zvolit na základě existujících údajů, aby se zabránilo nadměrné toxicitě u samic. Pokud je však u ošetřovaných samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí. Pokud několik březích zvířat vykazuje známky nadměrné toxicity, mělo by se zvážit utracení této skupiny. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se zvířatům podávat ve formě jediné dávky pomocí hadičky k výplachu žaludku nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Pokud se jako vehikulum používá kukuřičný olej, nemělo by množství překročit 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kolísání v množství zkoušené látky by se měla omezit nastavením koncentrací tak, aby se zajistilo konstantní množství na všech úrovních dávek.

1.6.6 **Sledování samic**

Klinická pozorování se provádějí a zaznamenávají minimálně jednou denně, a to každý den nejlépe ve stejnou dobu, a přihlédne se k době vrcholícího předpokládaného účinku po dávkování. Zaznamená se stav zvířat včetně mortality, agónie, relevantních změn chování a všech příznaků zjevné toxicity.

1.6.7 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy**

Zvířata se zváží během nultého dne gestace anebo nejpozději třetí den gestace, pokud externí chovatel dodává zvířata spářená ve stejnou dobu, první den podávání látky a minimálně každý třetí den v období podávání látky a dále v den plánovaného usmrcení.

▼B

Spotřeba potravy se zaznamená v třídenním intervalu a měla by se shodovat se dny zjišťování tělesné hmotnosti.

1.6.8 **Pitva**

Samice se usmrtí jeden den před očekávaným dnem vrhu. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného vrhu předcházejícího plánovanému usmrcení se usmrtí a podrobí důkladnému makroskopickému vyšetření.

Samice se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na strukturní odchylky nebo patologické změny. S cílem minimalizovat neobjektivnost se posuzování samic během císařského řezu a následná fetální analýza provedou pokud možno bez znalosti experimentální skupiny.

1.6.9 **Vyšetření děložního obsahu**

Okamžitě po usmrcení nebo co nejdříve po uhynutí se samicím vyjme děloha a zjistí se stav březosti. Dělohy, které nesvědčí o graviditě, se dále vyšetří (např. pomocí barvení sulfidem amonným u hlodavců a pomocí Salewského barvení nebo vhodnou alternativní metodou u králíků) a potvrdí se negravidní stav (5).

Gravidní děloha včetně děložního hrdla se zváží. Hmotnost gravidní dělohy by se neměla zjišťovat u zvířat, která během studie uhynula.

U březích zvířat se zjistí počet žlutých tělísek.

U děložního obsahu se vyšetří počet úhynů embrya nebo plodu a počet životaschopných plodů. Popíše se stupeň resorpce, aby bylo možné odhadnout relativní dobu uhynutí zárodku (viz část 1.2).

1.6.10 **Vyšetření plodů**

Zjistí se pohlaví a tělesná hmotnost každého plodu.

U každého plodu se vyšetří zevní odchylky (6).

U plodů se vyšetří změny kostry a měkkých tkání (např. odchylky a malformace nebo anomálie) (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Kategorizace fetálních změn je vhodná, ale nikoli nezbytná. Pokud se kategorizace provede, měla by se jasně stanovit kritéria definování jednotlivých kategorií. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozmnožovací soustavě, která se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

U hlodavců se pitvá přibližně polovina každého vrhu, u něhož se vyšetří změny skeletu. Zbytek se pitvá a vyšetří na přítomnost změn měkkých tkání pomocí uznaných nebo vhodných metod postupných histologických řezů nebo důkladné pitvy.

▼B

U nehlodavců, např. králíků, se prozkoumají jak změny měkkých tkání, tak změny skeletu všech plodů. Opatrným oddělením tkání se u těchto plodů vyšetří změny měkkých tkání, přičemž pitva může zahrnovat i postupy pro další vyhodnocení vnitřní stavby srdce (25). Hlavy poloviny plodů zkoumaných tímto způsobem se oddělí a použijí se k vyhodnocení změn měkkých tkání (včetně očí, mozku, nosních dutin a jazyka), a to pomocí standardních metod postupného segmentování (26) nebo stejně citlivých metod. Těla těchto i zbývajících neporušených plodů se pitvají a vyšetří na přítomnost změn skeletu za použití stejných metod popsaných pro hlodavce.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenají do tabulky samostatně pro samice a pro jejich potomky a u každé pokusné skupiny a každé generace se uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků zjištěné toxicity včetně nástupu, trvání a závažnosti případných toxických účinků, typy pozorování embryí/plodů a všechny důležité údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou, přičemž jako jednotka analýzy dat se použije vrh. Použije se všeobecně uznávaná statistická metoda; zvolí se jako součást návrhu studie a musí být zdůvodněna. Rovněž se uvedou údaje získané u zvířat, která nepřežila až do plánovaného usmrcení. Tyto údaje lze v případě potřeby zahrnout do skupinového průměru. Význam údajů získaných od těchto zvířat i jejich zahrnutí nebo nezahrnutí do průměru skupiny by měly být odůvodněny a individuálně posouzeny.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky studie prenatální vývojové toxicity se vyhodnotí na základě zjištěných účinků.Vyhodnocení bude obsahovat následující informace:

— výsledky zkoušky u samic a embrya/plodu, včetně hodnocení vazeb nebo jejich absence mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech nálezů,

— kritéria používaná pro kategorizaci zevních změn, změn měkkých tkání a skeletu u plodu, pokud byla tato kategorizace provedena,

▼B

— případně předchozí kontrolní údaje ke snazšímu objasnění výsledků studie,

— číselné hodnoty používané při výpočtu všech procentuálních hodnot nebo koeficientů,

— případně odpovídající statistickou analýzu výsledků studie, která by měla zahrnovat dostatečné informace o metodě analýzy, aby nezávislý posuzovatel/statistik mohl tuto analýzu přehodnotit a zrekonstruovat.

U studií, které prokazují nepřítomnost toxických účinků, je třeba zvážit další zkoušky pro zjištění absorpce a biologické dostupnosti zkoušené látky.

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Studie prenatální vývojové toxicity poskytuje informace o účinku opakované expozice látce na březí samice a na nitroděložní vývoj jejich potomstva. Výsledky studie by měly být objasněny v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Vzhledem k tomu, že se klade důraz jak na výslednou všeobecnou toxicitu z hlediska matky, tak i na vývojovou toxicitu, umožní výsledky této studie do určité míry rozlišit mezi vývojovými účinky vyskytujícími se v nepřítomnosti všeobecné toxicity a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí zvířata (27).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující specifické informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, a je-li to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje, včetně čísla CAS, je-li známo nebo přiděleno,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet a stáří zvířat;

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o přípravě složení zkoušené látky/stravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

▼B

— podrobné údaje o podávání zkoušené látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podmínky prostředí,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky:

Údaje o toxických reakcích matky podle dávky, např.:

— počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která přežila, počet březích zvířat, počet zvířat, která potratila, a počet zvířat, která předčasně vrhla,

— den úhynu během studie anebo zda zvířata přežila až do dne usmrcení,

— uvedou se údaje o zvířatech, která nepřežila do plánovaného usmrcení, nezahrnou se však do statistických srovnání dat pro skupiny,

— den zjištění každého abnormálního klinického příznaku a jeho následný průběh,

— tělesná hmotnost, změna tělesné hmotnosti a hmotnost gravidní dělohy, včetně případných údajů o změně tělesné hmotnosti korigované o hmotnost gravidní dělohy,

— spotřeba potravy, a měří-li se, spotřeba vody,

— pitevní nálezy včetně děložní hmotnosti,

— zaznamenají se hodnoty NOAEL účinků na matku a vývojové účinky.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s implantáty, včetně:

— počtu žlutých tělísek,

— počtu zahnízdění, počtu a procenta živých a mrtvých plodů a resorpcí,

— počtu procentuálního podílu pre- a postimplantačních ztrát.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s živými plody, včetně:

— počtu a procentuálního podílu živých potomků,

— poměru pohlaví,

— fetální tělesné hmotnosti, pokud možno podle pohlaví a pro obě pohlaví dohromady,

— zevních malformací, malformací měkkých tkání a skeletu a jiných významných odchylek,

— případně kritérií kategorizace,

▼B

— celkového počtu a procentuálního podílu plodů a vrhů s jakýmikoli zevními a kosterními odchylkami, odchylkami měkkých tkání a rovněž typů a výskytů individuálních anomálií a jiných významných odchylek.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.

2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.

3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.

4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247; 367.

6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381–391.

9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229–242.

10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291–306.

12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398–408.

14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.

15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼B

16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, s. 163–173.

17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.

18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red s Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.

19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.

20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.

21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, s. 251–277.

23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*. 28; 233–239.

25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.

26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, s. 126–144.

27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32 **STUDIE KARCINOGENITY**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 451 (2009). Původní pokyny TG 451 ke studiím karcinogenity byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.32 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (2), (3), (4), (5), (6). Aktualizace této zkušební metody B.32 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.30 této přílohy, Studie chronické toxicity, a kapitoly B.33 této přílohy, Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity, s cílem získat další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda B.32 je určena ke zkouškám široké škály chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií. V případě farmaceutik se však některé detaily a požadavky mohou lišit (viz pokyny S1B Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) testování karcinogenity léků).

2. Většina studií karcinogenity se provádí na hlodavcích, a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití ve studiích prováděných na těchto druzích. Je-li třeba provést studie na jiných druzích nežli z řádu hlodavců, lze rovněž použít příslušně pozměněné principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (6). Další pokyny jsou k dispozici v pokynech OECD č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích karcinogenity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích karcinogenity používá nejběžněji. Přestože studie karcinogenity zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být pro posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Takové studie je třeba navrhovat individuálně pro daný případ, přestože zde uvedená zkušební metoda pro posouzení a vyhodnocení karcinogenity při orálním podávání by mohla tvořit základ protokolu pro studie inhalační a/nebo dermální, pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd. Jsou k dispozici pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek dermální (7) a inhalační cestou (7), (8). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se mělo konkrétně nahlédnout do kapitoly B.8 této přílohy (9) a kapitoly B.29 této přílohy (10) a rovněž do pokynů OECD pro zkoušení akutní inhalační toxicity (8). V případě, že se zkoušky provádějí dermální cestou, je třeba nahlédnout do kapitoly B.9 této přílohy (11).

▼M4

5. Studie karcinogenity poskytuje informace o možných rizikách pro zdraví, která mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici trvající až celou dobu života použitých druhů. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky, včetně potenciální karcinogenity, a může určit cílové orgány a možnost akumulace. Může také pro toxické účinky poskytnout odhad hodnoty dávky nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky a v případě negenotoxických karcinogenů pro nádorové odpovědi, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií karcinogenity zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace karcinogenních vlastností zkoušené chemické látky vedoucích ke zvýšenému výskytu novotvarů, zvýšenému podílu maligních novotvarů nebo snížení doby do vzniku novotvarů ve srovnání se souběžnými kontrolními skupinami,

— identifikace cílového orgánu (cílových orgánů) karcinogenity,

— identifikace doby do vzniku novotvarů,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a nádorovou odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— extrapolace karcinogenních účinků na nízké úrovně expozice člověka,

— získání údajů k ověření hypotéz o způsobu účinku (2), (7), (12), (13), (14), (15).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie vzít v úvahu při posuzování a hodnocení potenciální karcinogenity zkoušené chemické látky veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení karcinogenního potenciálu a minimalizovala použití zvířat. Obzvlášť důležité jsou informace o způsobu účinku potenciálního karcinogenu a jeho posouzení (2), (7), (12), (13), (14), (15), neboť optimální uspořádání studie se může lišit podle toho, zda je zkoušená chemická látka známým genotoxickým karcinogenem nebo je u ní pouze podezření na genotoxickou karcinogenitu. Další pokyny k rozvahám o způsobu účinku jsou uvedeny v pokynech č. 116 (7).

8. Mezi informace, které usnadní vytváření plánu studie, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky všech testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo* včetně testů genotoxicity, předpokládaná použití a potenciální expozice u člověka, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenitě/genotoxicitě, karcinogenita a další toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látek, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích s opakovanou expozicí. Zhodnocení karcinogenity by se mělo provádět po získání prvotních informací o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity

▼M4

v opakovaných dávkách. Krátkodobé zkoušky iniciace–propagace nádoru mohou rovněž poskytnout užitečné informace. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách karcinogenity (16), (17), (18), (19).

9. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci na přežití, analýzu kumulativních nádorových rizik ve vztahu k době přežití, analýzu doby do vzniku nádoru a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (20).

10. Při provádění studie karcinogenity je nutné řídit se vždy zásadami a úvahami uvedenými v Pokynech OECD č. 19 k rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (21), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí pokračovat u zvířete ve zkoušce, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

11. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity naleznete v Pokynech č. 116 (7) a rovněž ve dvou publikacích ústavu International Life Sciences Institute (22) (23). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na straně jedné a charakterizací odezvy na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v situaci, kdy je nutné provést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) (odstavec 12).

12. Mělo by se zvážit, zda raději neprovést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy), a ne samostatné provedení studie chronické toxicity (tato zkušební metoda B.30) a studie karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů v porovnání s prováděním dvou samostatných studií a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 11 a 22–25) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie.

▼M4

13. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (7).

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Zkoušená chemická látka se podává denně v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat po většinu jejich života, obvykle orální cestou. Expozice inhalační nebo dermální cestou může být rovněž vhodná. Zvířata se pečlivě sledují s ohledem na příznaky toxicity a rozvoj neoplastických lézí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda se primárně zabývá posouzením a vyhodnocením karcinogenity u hlodavců (odstavec 2). Použití nehlodavců je možné zvážit, pokud dostupné údaje naznačují, že jsou pro předpověď účinků na lidské zdraví vhodnější. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Upřednostňovaným druhem hlodavců je potkan, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Přestože použití myší ve zkouškách karcinogenity může mít omezený užitek (24), (25), (26), jsou v některých stávajících regulačních programech zkoušky karcinogenity na myších ještě stále vyžadovány, pokud se neprokáže, že taková studie není z vědeckého hlediska nezbytná. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

16. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Studie karcinogenity by se měla provádět nejlépe na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v kratších předběžných studiích toxicity, i když je-li známo, že zvířata z tohoto kmene a zdroje nedosahují běžně uznávaných kritérií přežití v dlouhodobých studiích [viz Pokyny č. 116 (7)], měla by se zvážit možnost použít takový kmen zvířat, který má přijatelnou míru přežití v dlouhodobé studii. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

Umístění a krmení zvířat

17. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze, je-li to vědecky odůvodněné (27), (28), (29). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby čištění místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí v krmivu zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů, perzistentní

▼M4

organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měla poskytnout analýza pitné vody. Výběr krmiva může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

18. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť. Zvířata by měla být rozdělena náhodným výběrem do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

19. Měla by se použít obě pohlaví. Měl by se použít dostatečný počet zvířat umožňující důkladné biologické a statistické vyhodnocení. Každá exponovaná skupina a souběžná kontrolní skupina by proto měla obsahovat alespoň 50 zvířat od každého pohlaví. V závislosti na cíli studie může být možné zvýšit statistickou sílu klíčových odhadů rozdělením zvířat nerovnoměrně do skupin s různými dávkami, přičemž do skupin s nízkou dávkou se zařadí více než 50 zvířat, např. aby se odhadl karcinogenní potenciál při nízkých dávkách. Mírným zvýšením velikosti skupiny však statistická síla studie vzroste jen relativně málo. Další informace o statistickém uspořádání studie a výběru úrovní dávek k maximalizaci statistické síly jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

Zajištění předběžných utracení a satelitních (ověřovacích) skupin

20. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení např. v 12. měsíci, aby se získaly informace o progresi neoplastických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Pokud jsou v plánu studie zahrnuta předběžná utracení zvířat, v každé exponované skupině určených k předběžnému utracení je obvykle 10 zvířat od každého pohlaví a celkový počet zvířat zařazených do studie je nutno zvýšit o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Také je možné zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (30). Další pokyny jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

▼M4

Dávkové skupiny a dávkování

21. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Měly by se použít alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

22. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Za současného zohlednění faktorů uvedených v odstavci 23 níže by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %). Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možné zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka dokazující toxicitu, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost.

23. Je možné zvolit úrovně dávek a odstupňování úrovní dávek ke stanovení vztahu mezi dávkou a odezvou a NOAEL nebo jiných plánovaných výsledků studie, např. BMD (viz odstavec 25) na nejnižší úrovni dávky, a to v závislosti na způsobu účinku zkoušené chemické látky. Mezi faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, patří předpokládaná směrnici křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při kterých mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo způsobu toxického účinku, kde se předpokládá prahová hodnota nebo kde se předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek.

24. Interval mezi jednotlivými úrovněmi dávek bude záviset na vlastnostech zkoušené chemické látky a není možno jej v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení klesajících úrovní dávek; často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi velkých intervalů (např. více než přibližně 6–10násobek) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití koeficientů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

25. Jak je dále probráno v Pokynech č. 116 (7), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

▼M4

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka.

26. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy, která poslouží jako vhodnější kontrola.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

27. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě nebo sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

28. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Případně je třeba zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

29. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle horní mez neměla přesáhnout 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm) nebo konstantní dávkování v poměru k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti), která se vypočítá jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

30. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu), u hlodavců obvykle po dobu 24 měsíců (viz také odstavec 32). Jakýkoli jiný režim podávání, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (11) po dobu 24 měsíců. Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 24 měsíců. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (9).

31. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možné denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (31). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

32. Délka studie u hlodavců je obvykle 24 měsíců, což představuje větší část normální délky života používaných zvířat. Trvání studie je možné zkrátit nebo prodloužit podle délky života kmene zvířecího druhu použitého ve studii, mělo by se však uvést zdůvodnění. U určitých kmenů myší, např. AKR/J, C3H/J nebo C57BL/6J, může být vhodnější délka studie 18 měsíců. Dále jsou uvedeny pokyny ohledně délky a ukončení studie a přežití. Další pokyny včetně posouzení přijatelnosti negativní karcinogenity vzhledem k přežití ve studii jsou uvedeny v pokynech OECD č. 116 o Uspořádání a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

— O ukončení studie by se mělo uvažovat v případě, kdy počet přeživších zvířat ve skupinách s nižší dávkou nebo v kontrolní skupině poklesne pod 25 %.

— V případě, kdy v důsledku toxicity předčasně uhynou zvířata pouze ve skupině s vysokou dávkou, by se studie ukončit neměla.

— Přežití každého pohlaví by se mělo posuzovat odděleně.

— Studie by se neměla dosáhnout míry, při které již údaje ze studie nepostačují k provedení statisticky platného zhodnocení.

▼M4

POZOROVÁNÍ

33. Měla by se kontrolovat morbidita nebo mortalita u všech zvířat, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Dále by se mělo jednou denně kontrolovat, zda zvířata nevykazují konkrétní příznaky toxikologického významu a v případě podání nitrožaludečně by se měla vzít v úvahu doba očekávaných maximálních účinků po podání látky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozvoji nádorů a mělo by se zaznamenat, kdy se nádor objeví, kde, jeho rozměry, vzhled a progrese každého viditelného nebo hmatného tumoru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

34. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

Hematologická, klinická biochemická vyšetření a další měření

35. Aby se ze studie získalo co nejvíce informací, zejména pro úvahy o způsobu účinku, je možno dle uvážení vedoucího studie odebrat vzorky krve pro hematologická a klinická biochemická vyšetření. Rovněž může být vhodné provést rozbor moči. Další pokyny k významu odběru těchto vzorků v rámci studie karcinogenity jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Považuje-li se to za vhodné, je možno provést odběry vzorků pro hematologická a klinická biochemická vyšetření a rozbor moči jako součást předběžného utracení (odstavec 20) a na konci studie u nejméně 10 zvířat od každého pohlaví v každé skupině. Krevní vzorky by se měly odebírat v anestezii z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, a měly by se případně uchovávat ve vhodných podmínkách. Také je možno připravit k vyšetření krevní nátěry, zejména pokud se zdá, že je cílovým orgánem kostní dřeň, přestože hodnota takového vyšetření k zhodnocení karcinogenního/onkogenního potenciálu se zpochybňuje (32).

PATOLOGIE

Pitva

36. U všech zvířat zařazených do studie (kromě ověřovacích zvířat a ostatních satelitních zvířat, viz odstavec 20) se provede celková podrobná pitva zahrnující pečlivé vyšetření povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. V jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie může být třeba provést pitvu ověřovacích a ostatních satelitních zvířat. Měření hmotnosti orgánů obvykle nebývá součástí studie karcinogeneze, neboť geriatrické změny a v pozdějších stádiích rozvoj nádorů maří použitelnost údajů o hmotnosti orgánů. Mohou však být velmi důležité pro hodnocení průkaznosti důkazů, a zejména pro úvahy o způsobu účinku. Jsou-li součástí satelitní studie, měly by se získat nejpozději jeden rok po zahájení studie.

▼**M4**

37. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (33) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	rektum	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li zřejmé, že je možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dřeně a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeně
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin či nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou aplikace by se měl zachovat seznam orgánů stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření řídit doporučeními v kapitole B.8 a B.29 této přílohy. Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

▼M4

Histopatologické vyšetření

38. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (33). Měly by se vyšetřit minimálně tyto tkáně:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality včetně nádorů,

— pokud jsou ve skupině s vysokou dávkou pozorovány histopatologické změny související s expozicí, měly by se stejné tkáně vyšetřit u všech zvířat ve všech ostatních exponovaných skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

39. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících příslušný typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u průběžných dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

40. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenná historická kontrolní data, např. v případě, kdy existují známky toho, že souběžné kontroly se značně liší od posledních údajů získaných u kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historická kontrolní data, pokud se hodnotí, by měla být ze stejné laboratoře a měla by pocházet ze studie používající zvířata stejného věku a stejného kmene a měla by být z období pěti let předcházejících příslušné studii.

41. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a data, která se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 9). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

Protokol o zkoušce

42. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

▼**M4**

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk, a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata)

Obecné

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny, a případně spotřeba vody, pokud se uplatňuje,

— toxikokinetické údaje, jsou-li k dispozici,

— oftalmoskopické vyšetření (je-li k dispozici),

— hematologická vyšetření (jsou-li k dispozici),

— klinická biochemická vyšetření (jsou-li k dispozici).

▼M4

Klinické nálezy

— známky toxicity,

— incidence (plus závažnost, je-li hodnocena) jakékoli abnormality,

— povaha, závažnost a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé).

Pitevní údaje

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů a jejich poměry, pokud se stanovují,

— pitevní nálezy; incidence a závažnost abnormalit.

Histopatologické vyšetření

— histopatologické nálezy, které nejsou neoplastické,

— neoplastické histopatologické nálezy,

— vzájemný vztah mezi makroskopickými a mikroskopickými nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí, včetně klasifikace závažnosti,

— zprávy o všech odborných revizích vzorků.

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující

— diskuse o jakýchkoli modelovacích přístupech,

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— historické kontrolní údaje,

— posouzení jakýchkoli informací o způsobu účinku,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32:

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

6) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, k dispozici na veřejných webových stránkách OECD s pokyny ke zkoušení na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní opakovaná aplikace.

10) Kapitola B.29 této přílohy, Subchronická inhalační toxicita: 90denní studie.

11) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼**M4**

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

27) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely, Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M4

B.33 **KOMBINOVANÉ STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 453 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 453 byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.33 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (1), (2), (3), (4), (5). Aktualizace této zkušební metody B.33 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.32 této přílohy, Studie karcinogenity, a kapitoly B.30 této přílohy, Studie chronické toxicity, s cílem získat další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda je určena ke zkouškám širokého spektra chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií. V případě farmaceutik se však některé detaily a požadavky mohou lišit (viz pokyny S1B Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) testování karcinogenity léků).

2. Většina studií chronické toxicity a karcinogenity se provádí na různých druzích hlodavců a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití ve studiích prováděných právě na těchto druzích. Je-li třeba tyto studie provést na nehlodavcích, lze rovněž použít principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (6), jak je uvedeno v pokynech OECD Pokyny č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích chronické toxicity/karcinogenity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích chronické toxicity a karcinogenity používá nejběžněji. Přestože dlouhodobé studie zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být pro posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Takové studie je třeba navrhovat individuálně pro daný případ, přestože zde uvedená zkušební metoda pro posouzení a vyhodnocení chronické toxicity a karcinogenity při orálním podávání by mohla tvořit základ protokolu pro studie inhalační a/nebo dermální, pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd. Jsou k dispozici pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek inhalační (7), (8) a dermální cestou (7). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se mělo konkrétně nahlédnout do kapitoly B.8 této přílohy (9) a kapitoly B.29 této přílohy (10) a rovněž do pokynů OECD ke zkouškám akutní inhalační toxicity (8). V případě, že se zkoušky provádějí dermální cestou, je třeba nahlédnout do kapitoly B.9 této přílohy (11).

▼M4

5. Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, která mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici trvající až po celou dobu života použitého druhu. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky včetně potenciální karcinogenity a určí cílové orgány a možnost akumulace. Může také poskytnout odhad hodnoty dávky bez pozorovaných nepříznivých účinků pro toxické účinky a v případě negenotoxických karcinogenů pro nádorové odezvy, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií chronické toxicity/karcinogenity zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace karcinogenních vlastností zkoušené chemické látky vedoucích ke zvýšenému výskytu novotvarů, zvýšenému podílu maligních novotvarů nebo snížení doby do vzniku novotvarů ve srovnání se souběžnými kontrolními skupinami,

— identifikace doby do vzniku novotvarů,

— identifikace chronické toxicity zkoušené chemické látky,

— identifikace cílového orgánu (cílových orgánů) chronické toxicity a karcinogenity,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— extrapolace karcinogenních účinků na nízké úrovně expozice člověka,

— předpověď chronických toxických účinků na úrovních expozice člověka,

— získání údajů ke zkoušení hypotéz ohledně způsobu účinku (2), (7), (12), (13), (14), (15).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Před zahájením studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu při posuzování a hodnocení potenciální karcinogenity a chronické toxicity zkoušené chemické látky všechny dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení jejích toxikologických vlastností a minimalizovala použití zvířat. Obzvlášť důležité jsou informace o způsobu účinku potenciálního karcinogenu a jeho posouzení (2), (7), (12), (13), (14), (15), neboť optimální uspořádání studie se může lišit podle toho, zda je zkoušená chemická látka známý genotoxický karcinogen nebo je u ní pouze podezření na genotoxickou karcinogenitu. Další pokyny k rozvahám o způsobu účinku jsou uvedeny v pokynech č. 116 (7).

8. Informace, které pomůžou při utváření plánu studie, zahrnují identitu, chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, všechny informace o způsobu účinku, výsledky jakýchkoli testů toxicity včetně testů genotoxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozici u člověka, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenitě/genotoxicitě, karcinogenitě a další toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích s opakovanou expozicí. Stanovení chronické toxicity/karcinogenity by se mělo provádět pouze poté,

▼M4

co byly získány úvodní informace o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity po opakované dávce. Krátkodobé zkoušky iniciace – propagace mohou rovněž poskytnout užitečné informace. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách karcinogenity (16), (17), (18), (19).

9. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci na přežití, analýzu kumulativních nádorových rizik ve vztahu k době přežití, analýzu doby do vzniku nádoru a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (20).

10. Při provádění studie karcinogenity je nutné řídit se vždy vůdčími principy a úvahami uvedenými v Pokynech OECD o rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (21), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí, pokračovat u zvířete ve zkoušce, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

11. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity naleznete v Pokynech č. 116 (7) a rovněž ve dvou publikacích ústavu International Life Sciences Institute (22), (23). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na straně jedné a charakterizací odezvy na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v případě kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity.

12. Je třeba zvážit možnost provedení této kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity, namísto odděleného provádění studie chronické toxicity (kapitola B.30 této přílohy) a studie karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů a určité omezení použití zvířat v porovnání s prováděním dvou samostatných studií a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 11 a 22–26) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie. Další pokyny o uspořádání kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity s cílem dosáhnout maximální efektivity studie ve smyslu možností snížení počtu použitých zvířat a rovněž úpravou různých experimentálních postupů naleznete v Pokynech č. 116 (7).

▼M4

13. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (7).

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Plán studie se skládá ze dvou paralelních fází, chronické fáze a fáze karcinogenity (jejich délka viz odstavec 34 a 35). Zkoušená chemická látka se obvykle podává orální cestou, avšak zkoušky inhalační nebo dermální cestou mohou být také vhodné. V chronické fázi se zkoušená chemická látka podává denně v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, jedna úroveň dávky na každou skupinu, obvykle po dobu 12 měsíců, avšak je možné zvolit i delší nebo kratší dobu expozice v závislosti na regulačních požadavcích (viz odstavec 34). Tato doba trvání by se měla zvolit dostatečně dlouhá na to, aby umožnila manifestaci jakýchkoli účinků kumulativní toxicity bez zkreslujících příznaků geriatrických změn. Plán studie může rovněž zahrnovat jedno nebo více předběžných utracení, např. za 3 a 6 měsíců, a je možné přidat další skupiny zvířat, aby se tato skutečnost kompenzovala (viz odstavec 20. Ve fázi karcinogenity se zkoušená chemická látka se podává denně několika skupinám pokusných zvířat po většinu jejich života. Zvířata se v obou fázích pečlivě sledují s ohledem na příznaky toxicity a rozvoj neoplastických lézí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda se primárně zabývá posouzením a vyhodnocením toxicity a karcinogenity u hlodavců (odstavec 2). Použití nehlodavců lze zvážit, pokud dostupné údaje naznačují, že jsou pro předpověď účinků na lidské zdraví vhodnější. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Upřednostňovaným druhem hlodavců je potkan, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Přestože použití myší ve zkouškách karcinogenity může mít omezený užitek (24), (25), (26), jsou v některých stávajících regulačních programech zkoušky karcinogenity na myších ještě stále vyžadovány, pokud se neprokáže, že taková studie není z vědeckého hlediska nezbytná. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Plán a provedení studií chronické toxicity/karcinogenity u nehlodavců, jsou-li požadovány, by měly vycházet z principů uvedených v této zkušební metodě spolu s principy v kapitole B.27 této přílohy, 90denní studie orální toxicity po opakované aplikaci na nehlodavcích (6). Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

16. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity by se měla provádět na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v kratších předběžných studiích toxicity, přestože je-li známo, že zvířata z tohoto kmene a zdroje mívají potíže dosáhnout běžně uznávaných kritérií přežití v dlouhodobých studiích [viz Pokyny č. 116 (7)], měla by se zvážit možnost použít takový kmen zvířat, který má přijatelnou míru přežití v dlouhodobé studii. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

▼M4

Podmínky chovu a krmení

17. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze, pokud je to vědecky odůvodněné (27), (28), (29). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí ve stravě zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů, perzistentní organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měly poskytnout analytické informace o pitné vodě. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

18. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť. Zvířata by měla náhodným výběrem rozdělit do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

19. Měla by se použít obě pohlaví. Měl by se použít dostatečný počet zvířat umožňující důkladné biologické a statistické vyhodnocení. U hlodavců by proto každá exponovaná skupina (jak je uvedeno v odstavci 22) a souběžná kontrolní skupina určená k fázi karcinogenity měla obsahovat alespoň 50 zvířat od každého pohlaví. V závislosti na cíli studie může být možné zvýšit statistickou sílu klíčových odhadů rozdělením zvířat nerovnoměrně do skupin s různou dávkou, přičemž do skupin s nízkou dávkou se zařadí více než 50 zvířat, např. aby se odhadl karcinogenní potenciál při nízkých dávkách. Je však třeba přiznat, že mírné zvýšení velikosti skupiny povede pouze k relativně malému zvýšení statistické síly studie. V případě hlodavců by každá exponovaná skupina (jak je uvedeno v odstavci 22) a souběžná kontrolní skupina určená k fázi chronické toxicity měla obsahovat alespoň 10 zvířat od každého pohlaví. Je třeba upozornit, že je tento počet nižší než ve studii chronické toxicity (kapitola 30 této přílohy). Interpretace údajů

▼M4

pocházejících od omezeného počtu zvířat v každé skupině ve fázi chronické toxicity této kombinované studie však bude podepřena také údaji od většího počtu zvířat z fáze karcinogenity této studie. Ve studiích používajících myši může být nutné přidat další zvířata do každé exponované skupiny ve fázi chronické toxicity, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická vyšetření. Další informace o statistickém uspořádání studie a výběru úrovní dávek k maximalizaci statistické síly jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

Zajištění předběžných utracení, satelitní skupiny a ověřovacích zvířat

20. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení např. v 6. měsíci fáze chronické toxicity, aby se získaly informace o progresi non-neoplastických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Zvířata použitá ve fázi chronické toxicity této studie trvající obvykle 12 měsíců (odstavec 34) poskytnou údaje z předběžného utracení pro fázi karcinogenity této studie, čímž se dosáhne snížení celkového počtu použitých zvířat. Do fáze chronické toxicity studie lze rovněž zařadit satelitní skupiny za účelem sledování reverzibility jakýchkoli toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou, která se zkoumá. Tyto skupiny mohou být omezeny pouze na nejvyšší úroveň dávky ve studii a kontrolu. Také je možno zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (30). Další pokyny o uspořádání studie tak, aby zahrnovalo předběžná utracení, satelitní a ověřovací zvířata a zároveň se minimalizoval celkový počet použitých zvířat, jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

21. Pokud jsou v plánu studie zahrnuta satelitní zvířata a/nebo předběžná utracení zvířat, činí počet zvířat v každé exponované skupině určených k tomuto účelu obvykle 10 zvířat od každého pohlaví a celkový počet zvířat zařazených do studie je nutno zvýšit o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. U předběžně utracených a satelitních zvířat by se měly obvykle sledovat stejné parametry, jako u zvířat ve fázi chronické toxicity v hlavní studii, mezi něž patří tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody, hematologická a klinická biochemická měření a patologická vyšetření, nicméně měření se mohou také omezit (ve skupinách určených k předběžnému utracení) na konkrétní klíčové parametry, jakými jsou neurotoxicita a imunotoxicita.

Dávkové skupiny a dávkování

22. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). V chronické fázi i ve fázi karcinogenity by se měly použít alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

▼M4

23. V případě studie pro fázi chronické toxicity nemusí být úplná studie s použitím tří úrovní dávek nutná, pokud lze předpokládat, že zkouška provedená při jedné úrovni dávky nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den pravděpodobně nevyvolá nepříznivé účinky. Tato úvaha by se měla zakládat na informacích z předběžných studií a předpoklad, že k toxicitě nedojde, by měl vycházet z údajů od strukturně příbuzných chemických látek. Mezní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den se může použít s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

24. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Obvykle by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %). Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možno zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka podávající důkaz o toxicitě, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost.

25. Úrovně dávek a odstupňování úrovní dávek lze vybrat tak, aby mohly být stanoveny vztah mezi dávkou a odezvou a v závislosti na způsobu účinku zkoušené chemické látky také NOAEL nebo jiné plánované výsledky studie, např. BMD (viz odstavec 27). Mezi faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, patří předpokládaná směrnice křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při nichž mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo ve způsobu toxického účinku, u nějž se předpokládá prahová hodnota, nebo dávky, u nichž předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek. Při provádění kombinované studie karcinogenity/chronické toxicity je hlavním cílem získat informace pro účely posouzení rizika karcinogenity a informace o chronické toxicitě jsou obvykle vedlejším cílem. Tuto skutečnost je třeba mít ve studii na paměti při výběru úrovní dávek a jejich odstupňováním.

26. Interval mezi jednotlivými úrovněmi dávek bude záviset na cílech studie a vlastnostech zkoušené chemické látky a není možné je v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení sestupných úrovní dávek, a často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi velkých intervalů (např. více než faktor přibližně 6–10) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití faktorů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

27. Jak je dále uvedeno v Pokynech č. 116 (7), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

▼M4

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka, zejména při výběru středních a nízkých dávek.

28. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy, která poslouží jako vhodnější kontrola.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

29. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě, nebo žaludeční sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo v životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

30. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Je třeba podle potřeby zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

31. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle neměla přesáhnout horní mez 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti) vypočítané jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

32. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu) po dobu 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity), viz také odstavec 33 a 34. Jakýkoli jiný režim dávkování, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (11), po dobu 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity). Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity). Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (9).

33. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaluludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možno denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (31). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

34. Období podávání dávky a délka chronické fáze této studie je obvykle 12 měsíců, avšak uspořádání studie umožňuje a lze jej použít rovněž ke kratším (např. 6 nebo 9 měsíců) nebo delším (např. 18 nebo 24 měsíců) studiím, v závislosti na požadavcích konkrétních regulačních rámců nebo k specifickým mechanistickým účelům. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Všechny exponované skupiny zařazené do této fáze budou v určenou dobu ukončeny ke zhodnocení chronické toxicity a non-neoplastické patologie. Satelitní skupiny zahrnuté pro monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou by se měly udržovat bez podávání látky po dobu ne kratší než 4 týdny a ne delší než jedna třetina celkové délky studie po skončení expozice.

35. Délka fáze karcinogenity této studie bude u hlodavců obvykle 24 měsíců, což představuje většinu normální délky života používaných zvířat. Je možné použít kratší nebo delší dobu trvání studie, v závislosti na délce života kmene zvířecího druhu použitého ve studii, avšak mělo by to být zdůvodněno. U určitých kmenů myší, např. AKR/J, C3H/J nebo C57BL/6J, může být vhodnější délka studie 18 měsíců. Dále jsou uvedeny pokyny ohledně délky a ukončení studie a přežití, další pokyny včetně posouzení přijatelnosti negativní karcinogenity vzhledem k přežití ve studii jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7):

▼M4

— O ukončení studie by se mělo uvažovat v případě, kdy počet přeživších zvířat ve skupinách s nižší dávkou nebo v kontrolní skupině poklesne pod 25 %.

— K ukončení studie by neměla vést situace, kdy v důsledku toxicity předčasně uhynou zvířata pouze ve skupině s vysokou dávkou.

— Přežití každého pohlaví by se mělo posuzovat odděleně.

— Studie by se neměla rozšiřovat do takové míry, kdy údaje ze studie již nestačí k provedení statisticky platného zhodnocení.

POZOROVÁNÍ (FÁZE CHRONICKÉ TOXICITY)

36. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaných maximálních účinků po podání látky v případě podání žaludeční sondou.

37. Před první expozicí látce (za účelem intraindividuálního porovnání), na konci prvního týdne studie a dále jednou měsíčně se by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat. Protokol pozorování by se měl uspořádat tak, aby byly odchylky mezi jednotlivými pozorovateli minimalizovány a byly nezávislé na experimentální skupině. Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zaznamenat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (32).

38. Před prvním podáním zkoušené chemické látky by se mělo u všech zvířat provést oftalmologické vyšetření s použitím oftalmoskopu nebo jiného vhodného přístroje. Na konci studie by se toto vyšetření mělo provést nejlépe u všech zvířat, avšak minimálně ve skupinách s vysokou dávkou a kontrolních skupinách. Zjistí-li se změny na očích související s podáním látky, měla by se vyšetřit všechna zvířata. Pokud analýza struktury nebo jiné informace naznačují toxicitu pro oko, měla by se četnost provádění očního vyšetření zvýšit.

39. U chemických látek, kde předchozí 28denní a/nebo 90denní zkoušky toxicity po opakované dávce ukázaly schopnost vyvolat neurotoxické účinky, je možné volitelně vyšetřit senzorickou reaktivitu na různé druhy stimulů (32) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní stimuly) (33), (34), (35), sílu úchopu (36) a motorickou aktivitu (37) před zahájením studie a v tříměsíčních intervalech po začátku studie až do 12 měsíců včetně a rovněž při ukončení studie (je-li delší než 12 měsíců). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

▼M4

40. U chemických látek, kde předchozí 28denní a/nebo 90denní zkoušky toxicity po opakované dávce ukázaly schopnost vyvolat imunotoxické účinky, je možné na konci studie volitelně provést další vyšetření tohoto cílového parametru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

41. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

Hematologická a klinická biochemická vyšetření

42. Ve studiích na hlodavcích by se měla hematologická vyšetření provádět u všech zvířat ve studii (10 samců a 10 samic v každé skupině), 3., 6. a 12. měsíc a rovněž na konci studie (trvá-li déle než 12 měsíců). V případě myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická měření (viz odstavec 19). Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech) v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření v 3. měsíci jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na hematologické parametry. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii.

43. Měly by se vyšetřit následující parametry (38): celkový počet leukocytů a diferenciální rozpočet leukocytů, počet erytrocytů, počet trombocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokrit (objem erytrocytů), střední objem erytrocytu (MCV), průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH), průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Dle potřeby lze změřit také další hematologické parametry, jako jsou Heinzova tělíska či jiné atypické morfologické formy erytrocytu nebo methemoglobin, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově by se mělo postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky. Jestliže má zkoušená chemická látka účinek na hematopoetický systém, může být indikováno také vyšetření počtu retikulocytů a cytologie kostní dřeni, přestože se tato vyšetření nemusí provádět rutinně.

44. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům ve studii (10 samcům a 10 samicím v každé skupině) ve stejných časových intervalech stanovených pro hematologická vyšetření. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná biochemická vyšetření. Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech) v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření v 3. měsíci, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na klinické biochemické parametry. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat

▼M4

zvířata (s výjimkou myší) přes noc nalačno ([1]). Měly by se vyšetřit následující parametry (38): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinin, celkový protein, albumin, vápník, sodík, draslík, celkový cholesterol, alespoň dva vhodné testy pro hepatocelulární vyšetření (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, glutamátdehydrogenáza, celkové kyseliny žlučové) (39) a alespoň dva vhodné testy pro hepatobiliární vyšetření (alkalická fosfatáza, gamaglutamyltransferáza, 5'-nukleotidáza, celkový bilirubin, celkové kyseliny žlučové) (39). Dle potřeby je možné změřit také další klinické biochemické parametry, např. triglyceridy nalačno, specifické hormony a cholinesterázu, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově je třeba postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky.

45. Rozbor moči by se měl provést u všech zvířat ve studii (10 samců a 10 samic v každé skupině) s použitím vzorků odebraných ve stejných intervalech jako u hematologických a klinických biochemických vyšetření. Měření v 3. měsíci se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na složení moči. Odborné doporučení pro klinické patologické studie zahrnovalo následující parametry (38): vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, celkový protein a glukóza. Další stanovení zahrnují ketony, urobilinogen, bilirubin, a okultní krev. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další parametry.

46. Obecně se má za to, že ve studiích na psech je třeba před expozicí změřit výchozí hematologické a klinické biochemické parametry, avšak ve studiích na hlodavcích se stanovovat nemusí (38). Pokud jsou však historické výchozí údaje (viz odstavec 58) nedostatečné, je třeba zvážit získání těchto údajů.

PATOLOGIE

Pitva

47. U všech zvířat zařazených do studie se obvykle provede celková podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Nicméně je také možno zajistit (ve skupině pro předběžná utracení nebo v satelitní skupině), aby se měření omezila na konkrétní klíčové parametry, jako je neurotoxicita či imunotoxicita (viz odstavec 21). Tato zvířata se nemusí pitvat ani se u nich neprovádí postupy popsané v následujících odstavcích. U ověřovacích zvířat může být třeba provést pitvu v jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie.

([1]) Pro řadu stanovení v séru a plazmě, zejména pro glukózu, je vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Je však nutno upozornit, že hladovění přes noc může mít vliv na celkový metabolismus zvířat a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Všechna zvířata by se měla vyšetřovat ve stejném fyziologickém stavu, a proto by se měla podrobná nebo neurologická vyšetření raději naplánovat na jiný den než odběr vzorků pro klinická biochemická vyšetření.

▼**M4**

48. U všech zvířat, kromě zvířat vyloučených v druhé části odstavce 47 by se měly zvážit orgány. Nadledvinky, mozek, nadvarlata, srdce, ledviny, játra, vaječníky, slezina, varlata, štítná žláza (vážená po fixaci, s příštítnými tělísky) a děloha všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by se měly zbavit všech přirostlých tkání a co nejdříve po vyjmutí ve vlhkém stavu zvážit, aby nedošlo k vyschnutí.

49. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (40) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	*rektum*	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[sternum],	řez kostní dřeně a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeně
Harderova žláza			

▼M4

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou podání by se měl vyšetřit stejný seznam orgánů, jako byl stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními v kapitole B.8 této přílohy (9) a kapitole B.29 této přílohy (10). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

50. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (40). Histopatologická vyšetření by měla minimálně zahrnovat:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně ze zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality,

— cílové tkáně nebo tkáně, které vykazují změny v souvislosti s expozicí ve skupině s vysokou dávkou, u všech zvířat ve všech ostatních experimentálních skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

POZOROVÁNÍ (FÁZE KARCINOGENITY)

51. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Zvířata by se měla navíc jednou denně kontrolovat s ohledem na specifické příznaky, které mají toxikologický význam. V případě studií s podáváním látky žaludeční sondou by se měla zvířata kontrolovat v době těsně po podání dávky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozvoji nádorů a měla by se zaznamenat doba objevení se nádoru, umístění, rozměry, vzhled a progrese každého viditelného nebo hmatného tumoru.

52. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼M4

Hematologická, klinická biochemická vyšetření a další měření

53. Aby se ze studie získalo co nejvíce informací, zejména pro úvahy o způsobu účinku, je možné odebrat vzorky krve pro hematologická a klinická biochemická vyšetření, přestože to závisí na uvážení vedoucího studie. Rovněž může být vhodné provést rozbor moči. Údaje o zvířatech použitých ve fázi chronické toxicity studie, která obvykle trvá 12 měsíců (odstavec 34), poskytnou informace o těchto parametrech. Další pokyny o hodnotě odběru těchto vzorků v rámci studie karcinogenity jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Jestliže se odebírají vzorky krve, měly by se odebrat na konci zkušebního období těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu. Měly by se odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii. Také je možné připravit k vyšetření krevní nátěry, zejména pokud se zdá, že je cílovým orgánem kostní dřeň, přestože hodnota takového vyšetření krevních nátěrů k zhodnocení karcinogenního/onkogenního potenciálu ve fázi studie zkoumající karcinogenitu byla zpochybňována (38).

PATOLOGIE

Pitva

54. U všech zvířat zařazených do studie, kromě ověřovacích zvířat a ostatních satelitních zvířat (viz odstavec 20), se provede celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. U ověřovacích a ostatních satelitních zvířat může být třeba provést pitvu v jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie. Měření hmotnosti orgánů obvykle nebývá součástí studie karcinogeneze, neboť geriatrické změny a, v pozdějších stádiích, rozvoj nádorů maří použitelnost údajů o hmotnosti orgánů. Mohou však být velmi důležité pro hodnocení průkaznosti důkazů a zejména pro úvahy o způsobu účinku. Jsou-li součástí satelitní studie, měly by se získat nejpozději jeden rok po zahájení studie.

55. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (40) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	*rektum*	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř

▼M4

dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou podání by se měl vyšetřit stejný seznam orgánů, jako byl stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními v kapitole B.8 této přílohy (8) a kapitole B.29 této přílohy (9). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

56. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (40). Měly by se vyšetřit minimálně tyto tkáně:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality včetně nádorů,

— pokud jsou ve skupině s vysokou dávkou pozorovány histopatologické změny související s expozicí, měly by se stejné tkáně vyšetřit u všech zvířat ve všech ostatních exponovaných skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ (KARCINOGENITA A CHRONICKÁ TOXICITA)

Údaje

57. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u spojitých dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

58. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenná historická kontrolní data, např. v případě, kdy existují známky toho, že souběžné kontroly se značně vymykají ve srovnání s posledními údaji získanými u kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historická kontrolní data, pokud se hodnotí, by měla být ze stejné laboratoře a měla by pocházet od zvířat stejného věku a ze stejného kmene během pěti let předcházejících příslušné studii.

59. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a data, která se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 9). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

60. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče, (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk, a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

▼M4

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata):

Obecné

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny a případně spotřeba vody,

— toxikokinetické údaje, jsou-li k dispozici,

— oftalmoskopické vyšetření (je-li k dispozici),

— hematologická vyšetření (jsou-li k dispozici),

— klinická biochemická vyšetření (jsou-li k dispozici).

Klinické nálezy

— známky toxicity,

— incidence (plus závažnost, je-li hodnocena) jakékoli abnormality,

— povaha, závažnost a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé).

Pitevní údaje

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů a jejich poměry, pokud se stanovují,

— pitevní nálezy; incidence a závažnost abnormalit.

Histopatologické vyšetření

— histopatologické nálezy, které nejsou neoplastické,

— neoplastické histopatologické nálezy,

▼M4

— vzájemný vztah mezi makroskopickými a mikroskopickými nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí, včetně klasifikace závažnosti,

— zprávy o všech odborných revizích vzorků.

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující:

— diskuse o jakýchkoli modelovacích přístupech,

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— historické kontrolní údaje,

— posouzení jakýchkoli informací o způsobu účinku,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

6) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na veřejných webových stránkách OECD pro pokyny ke zkoušení na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní studie.

10) Kapitola B.29 této přílohy, Subchronická inhalační toxicita: 90denní studie.

11) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

▼M4

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

27) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely, Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

39) (Návrh) dokumentu agentury EMEA 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼B

B.34 **JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává několika skupinám samic a samců v odstupňovaných dávkách. Samcům se podává zkoušená látka v době růstu a v průběhu alespoň jednoho úplného spermatogenního cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na spermatogenezi.

Samicím rodičovské generace (P) se podává látka po dobu alespoň dvou estrálních cyklů, aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na strus. Zvířata jsou poté připuštěna. V době připuštění se zkušební látka podává zvířatům obou pohlaví, v době březosti a laktace pouze samicím. Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 *Příprava*

Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Doporučuje se podávat zkoušenou látku v potravě nebo v pitné vodě. Jiné způsoby podání jsou také přijatelné. Všem zvířatům se zkoušená látka podává po celou dobu zkoušky stejnou metodou. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky.

▼B

Látka se podává sedm dní v týdnu.

1.6.2 Pokusná zvířata

Výběr druhu

Upřednostňovanými druhy jsou potkan nebo myš. Používají se zdravá zvířata, dosud nepoužitá pro jiné experimenty. Používaný kmen by neměl mít nízkou plodnost. Pokusná zvířata musí být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a/nebo věku.

Plodnost musí být ověřena vhodným způsobem u obou pohlaví. Zvířata v experimentální i kontrolní skupině musí být odstavena před zahájením aplikace.

Počet a pohlaví

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu.

Cílem je získat dostatečný počet březích samic a dostatečné potomstvo, a tím zajistit spolehlivé hodnocení vlivu látky na plodnost, průběh březosti a mateřské chování v generaci P a laktaci, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí do odstavení.

1.6.3 Zkušební podmínky

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před vrhem se březí samice přemístí do oddělených vrhních nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

1.6.3.1 Úrovně dávek

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené látky vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Snižuje-li zkoušená látka příjem a využití potravy, může být nezbytné použít párově krmenou kontrolní skupinu. Pokud to dovolují fyzikálně-chemické vlastnosti nebo biologické účinky zkoušené látky, má nejvyšší dávka v ideálním případě vyvolávat toxicitu, avšak nikoli uhynutí v rodičovské populaci zvířat (P). Střední dávka (dávky) by měla vyvolávat minimální toxické účinky, které by mohly být připisovány zkoušené látce, a nejnižší dávka by neměla vyvolávat žádné pozorovatelné nepříznivé účinky ani u rodičů ani u potomstva. Při podání sondou nebo v kapslích se dávka stanoví individuálně na základě hmotnosti zvířete a každý týden se přizpůsobuje podle změny hmotnosti. U březích samic mohou být dávky popřípadě určeny na základě tělesné hmotnosti v 0. nebo 6. dni březosti.

1.6.3.2 Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg/kg žádné důkazy o vlivu na reprodukční schopnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné. Pokud předběžná studie prokáže, že vysoká dávka vyvolávající u matek jasné příznaky toxicity nemá nepříznivé účinky na plodnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné.

▼B

1.6.3.3 *Provedení zkoušky*

Plán pokusu

Denní podávání samcům rodičovské generace (P) se zahájí ve věku pěti až devíti týdnů po nejméně pětidenní aklimatizaci po odstavení. U potkana se v podávání pokračuje po 10 týdnů do období připouštění (u myši osm týdnů). Samci se buď utratí a vyšetří na konci období připouštění, nebo se pokračuje v podávání a samci mohou být použiti pro produkci druhého vrhu a utratí se a vyšetří ještě před koncem studie. U samic rodičovské generace (P) se podávání zahájí po nejméně pětidenní aklimatizaci a pokračuje se v něm alespoň do doby dvou týdnů před obdobím připouštění. V denním podávání se poté pokračuje po celé tři týdny období připouštění, v době březosti a poté až do odstavení generace F_1. Může být nezbytné změnit plán dávkování podle dostupných znalostí o vlastnostech zkoušené látky, např. o indukci metabolismu a/nebo bioakumulaci.

Postup při připouštění

Ve studiích toxicity pro reprodukci je možné použít párování 1:1 (jeden samec a jedna samice) anebo 1:2 (jeden samec a dvě samice).

V případě párování 1:1 se samice ponechá s týmž samcem do zabřeznutí nebo po dobu tří týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Dnem 0 březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie.

Páry, u kterých nedojde k oplodnění, se vyšetří s cílem zjistit důvod neplodnosti.

Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

Velikost vrhů

Zvířatům exponovaným ve studii fertility se ponechá možnost vrhit normálně a pečovat o své potomstvo do okamžiku odstavení bez standardizace velikosti vrhů.

Při standardizaci vrhů se doporučuje následující postup. Mezi 1. a 4. dnem po vrhu se velikost všech vrhů upraví vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu 4 samců a 4 samic na vrh.

Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři z každého pohlaví, je možné se tomu částečně přizpůsobit (např. ponechat pět samců a tři samice). Vrhy s méně než osmi potomky nelze standardizovat.

▼B

1.6.4 Pozorování

Po dobu zkoušky se každé zvíře pozoruje alespoň jednou denně. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Před obdobím připouštění i během něho se denně měří příjem potravy. Po vrhu a v průběhu laktace se měří příjem potravy (a vody, pokud se látka podává v pitné vodě) ve stejný den, kdy se váží potomstvo. Samci a samice rodičovské generace (P) se váží první den podávání a poté týdně. Všechna pozorování se zaznamenávají individuálně pro každé dospělé zvíře.

Doba gestace se počítá ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po vrhu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií.

Mrtvá mláďata a mláďata utracená ve 4. dnu se uchovají pro vyšetření na možné defekty. Živá mláďata se spočítají a celé vrhy se zváží ráno po vrhu, ve 4. a 7. dnu a poté každý týden do ukončení studie, kdy se zvířata zváží jednotlivě.

Zaznamenávají se všechny pozorované abnormality v chování a fyzickém stavu matek nebo potomstva.

1.6.5 *Patologie*

1.6.5.1 Pitva

Po utracení nebo úmrtí během studie se všechna zvířata generace P makroskopicky vyšetří na strukturní abnormality anebo patologické změny, přičemž se zvláštní pozornost věnuje orgánům reprodukčního systému. Uhynulá mláďata nebo mláďata v agónii se vyšetří na defekty.

1.6.5.2 Histopatologická vyšetření

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné váčky, prostata, koagulační žláza, hypofysa a cílový orgán (cílové orgány) všech zvířat generace P se uchovají pro mikroskopické vyšetření. V případě, že tyto orgány dosud nebyly vyšetřeny v jiných studiích s více dávkami, provede se podle možnosti mikroskopické vyšetření u všech zvířat ze skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolní skupiny a dále u zvířat, která uhynula v průběhu studie.

Orgány, které u těchto skupin zvířat vykazovaly abnormality, se vyšetří i u zvířat generace P ostatních dávkových skupin. V těchto případech se mikroskopicky vyšetří všechny tkáně vykazující makroskopické změny. Jak již bylo doporučeno v oddíle o připouštění, mohou být reprodukční orgány zvířat podezřelých z neplodnosti podrobeny mikroskopické analýze.

▼B

2. **ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet plodných samců, počet březích samic, typ změn a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy změn.

Podle možnosti se numerické výsledky vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli všeobecně uznávaná statistická metoda.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— druh/kmen použitých zvířat,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a životaschopnosti,

— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do plánovaného utracení nebo do konce studie,

— tabulka s údaji o hmotnosti každého vrhu, průměrné hmotnosti mláďat a individuální hmotnosti potomků při ukončení studie,

— toxické a další účinky pro reprodukci, potomstvo a postnatální růst,

— den, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat generace P,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.35 **DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY**

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 416 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení dvougenerační reprodukce je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinků zkoušené látky na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy, včetně funkcí pohlavních žláz, estrálního cyklu, způsobu chování při páření, plození, gestaci, vrhu, laktaci, odstavení, růstu a vývoje potomstva. Studie může rovněž poskytnout informace o účinku zkoušené látky na neonatální nemocnost a úmrtnost a předběžné informace o prenatální a postnatální vývojové toxicitě a může sloužit jako návod pro další zkoušky. Mimo zkoumání růstu a vývoje generace F_1 je tato zkušební metoda určena rovněž k hodnocení integrity a výkonnosti samčí a samičí rozmnožovací soustavy a rovněž růstu a vývoje generace F_2. S cílem získat další informace o vývojové toxicitě a funkčních poruchách lze do tohoto protokolu začlenit další prvky studie, přičemž jako vhodné se jeví metody vývojové toxicity a/nebo vývojové neurotoxicity, anebo lze tyto konečné výsledky zkoumat v samostatných studiích pomocí vhodných metod zkoušení.

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům z generace P se látka podává během růstu a během minimálně jednoho dokončeného spermatogenetického cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby bylo možné zachytit jakékoliv nepříznivé účinky na spermatogenezi. Účinky na spermie se stanoví pomocí parametrů pro spermie (např. morfologie a motilita spermií), z pitvy tkání a podrobné histopatologie. Jsou-li k dispozici informace o spermatogenezi z předešlých dostatečně dlouhých studií opakovaného dávkování, např. 90denní studie, není do hodnocení nutné zahrnovat samce z generace P. Tyto vzorky nebo digitální záznamy o spermiích z generace P je však vhodné uchovat pro možnost pozdějšího vyhodnocení. Samicím z generace P se látka podá během růstu a během několika dokončených estrálních cyklů, aby bylo možné odhalit jakékoliv nepříznivé účinky zkoušené látky na normální průběh estrálního cyklu. Zkoušená látka se podává rodičovské (P) generaci zvířat během jejich páření, následné březosti a až do doby odstavení jejich potomstva F_1. Po odstavení se u generace F_1 v podávání látky pokračuje během růstu až do dospělosti, v průběhu páření a produkce generace F_2 a až do doby, kdy dojde k odstavení generace F_2.

U všech zvířat se provádějí klinická sledování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na její vliv na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na růst a vývoj jejich potomstva.

▼B

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 **Výběr živočišných druhů**

Nejvhodnějším druhem pro testování je potkan. Použití jiných druhů je třeba zdůvodnit a provést odpovídající úpravy. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Na začátku studie by měly být u používaných zvířat jen minimální odchylky hmotnosti, které by neměly překročit 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví.

1.3.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené látky, je-li látka podávána tímto způsobem.

Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po spáření je třeba umístit oplodněné samice individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Oplodněné potkany lze rovněž chovat v malých skupinách a oddělit jeden až dva dny před vrhem. Když se blíží doba vrhu, je nutné oplodněným zvířatům poskytnout odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda.

1.3.3 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. K dispozici by měly být veškeré informace o sourozeneckých vztazích, aby se nepářili sourozenci. Zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin (doporučuje se rozdělení podle tělesné hmotnosti). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přiřadí vlastní identifikační číslo. U generace P se tato čísla přiřadí před zahájením podávání dávek. U generace F_1 je nutné přidělit tato čísla po odstavení zvířat vybraných k páření. U všech vybraných zvířat generace F_1 se vedou záznamy označující původ vrhu. Kromě toho se doporučuje individuální identifikace mláďat co nejdříve po narození, kdy se provádí individuální vážení mláďat nebo jakékoliv funkční zkoušky.

Na začátku podávání dávek musí být rodičovská (P) generace zvířat stará přibližně 5 až 9 týdnů. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk.

▼B

1.4 POSTUP

1.4.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu. To pravděpodobně nebude možné u látek, které vyvolávají nežádoucí účinky spojené s aplikací (např. sterilitu, nadměrnou toxicitu při vysoké dávce). Cílem je získat dostatečný počet březích samic, a tím zajistit smysluplné hodnocení potenciálu dané látky na plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat, růst a vývoje potomstva generace F_1 od doby početí až do doby dospělosti a vývoj jejich potomstva (F_2) až do odstavení. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat (tj. 20), nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu.

1.4.2 **Příprava dávek**

Není-li jiný vhodnější způsob aplikace (např. kožní nebo inhalační), doporučuje se orální podávání zkoušené látky (ve stravě, pitné vodě nebo pomocí žaludeční sondy).

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Stanoví se stálost zkoušené látky v daném vehikulu.

1.4.3 **Dávkování**

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Není-li dávka limitována fyzikálně-chemickou podstatou nebo biologickými účinky zkoušené látky, zvolí se nejvyšší úroveň dávky tak, aby vyvolala toxicitu, ale nezpůsobila úhyn nebo značné utrpení. V případě neočekávané úmrtnosti jsou obvykle ještě přijatelné studie s úmrtností rodičovských (P) zvířat nižší než přibližně 10 %. Ve snaze prokázat jakoukoli reakci související s dávkováním a s hodnotou dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL) se zvolí sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). U studií stravy by dávky neměly být více než trojnásobné. Při výběru úrovně dávek je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě, a to zvláště v případě výsledků studií po opakované dávce. Rovněž je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující informace o metabolismu a kinetice zkoušené sloučeniny nebo příbuzných látek. Tyto informace navíc napomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

▼B

Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum pro aplikaci zkoušené látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se vehikulum, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu. Podává-li se zkoušená látka ve stravě a způsobuje-li snížený příjem nebo využití potravy, pak je třeba zvážit nutnost použití párově krmené kontrolní skupiny. Jinak lze místo souběžné párově krmené kontrolní skupiny použít údaje získané z kontrolovaných studií určených k hodnocení účinků snížené spotřeby potravy na reprodukční parametry.

Pozornost je třeba věnovat následujícím typickým znakům vehikula a jiných přísad: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus, a/nebo retenci zkoušené látky, dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vlivu na spotřebu potravy, vody nebo nutriční stav zvířat.

1.4.4 **Limitní zkouška**

Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den a/nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů předepsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjistitelnou toxicitu ani u rodičovských zvířat, ani u jejich potomstva a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných sloučeninách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky.

1.4.5 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka se podává zvířatům 7 dnů v týdnu. Upřednostňuje se orální způsob podávání (ve stravě, pitné vodě nebo žaludeční sondou). Pokud se používá jiný způsob podávání, je třeba podat zdůvodnění a provést odpovídající modifikace. Všem zvířatům by měla být látka během odpovídajícího experimentálního období podávána stejným způsobem. Je-li látka podávána žaludeční sondou, podává se hadičkou určenou k výplachu žaludku. Množství jednorázově podávané tekutiny by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (u kukuřičného oleje maximum představuje dávka 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti), výjimkou jsou vodní roztoky, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, které ve vyšších koncentracích obvykle odhalí další zhoršení účinků, se proměnlivost množství zkoušené látky sníží nastavením takové koncentrace, která zajistí konstantní množství na všech úrovních dávek. Ve studiích zaměřených na podávání látky žaludeční sondou budou mláďata dostávat zkoušenou látku obvykle nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích zaměřených na podávání látky ve stravě nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktačního období sama žrát.

▼B

U látky podávané ve stravě nebo pitné vodě je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky nebránilo vyváženosti běžné stravy nebo vody. Je-li zkoušená látka podávána ve stravě, je třeba používat buď konstantní koncentrace (ppm) ve stravě, nebo konstantní úrovně dávky ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete. Použití jiného způsobu je třeba zdůvodnit. Látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Při přizpůsobování dávky podle hmotnosti u podávání látky sondou je třeba vzít v úvahu informace týkající se placentární distribuce.

1.4.6 **Plán zkoušky**

S každodenním podáváním zkoušené látky se u rodičovské generace (P) samců a samic zahájí od 5. do 9. týdne věku. Denní podávání látky u samců a samic generace F_1 je třeba zahájit po jejich odstavení; stále je třeba mít na paměti, že v případě, kdy se zkoušená látka podává prostřednictvím stravy nebo pitné vody, může docházet k přímé expozici mláďat F_1 zkoušené látce již během laktačního období. U obou pohlaví (P i F^1) by se mělo s podáváním látky pokračovat alespoň 10 týdnů před obdobím páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během dvoutýdenního období páření. Nejsou-li samci již potřební k hodnocení reprodukčních účinků, měli by být humánním způsobem utraceni a vyšetřeni. U rodičovské generace (P) samic dávkování pokračuje i během březosti a až do odstavení potomstva generace F_1. Pozornost je třeba věnovat modifikacím dávkovacího programu na základě dostupných informací o zkoušené látce, včetně existujících údajů o toxicitě, indukci metabolismu nebo bioakumulaci. Obvykle by dávka pro jednotlivá zvířata měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti.

Podávání látky samcům a samicím generací P a F_1 pokračuje až do doby jejich utracení. Všichni dospělí samci a samice generace P a F_1 se humánním způsobem utratí, pokud již nejsou potřební k hodnocení reprodukčních účinků. Potomstvo generace F_1, které není vybráno k páření, a celé potomstvo generace F_2 se po odstavení humánním způsobem utratí.

1.4.7 **Páření**

1.4.7.1 *Připouštění rodičovské generace (P)*

U každého páření se samice umístí s jedním samcem se stejnou úrovní dávek (páření 1:1), dokud nedojde ke spáření, nebo po dobu alespoň 2 týdnů. Každý den se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Nultým dnem březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie. V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny. Spářené páry se v záznamech jasně označí. Je třeba se vyvarovat páření sourozenců.

▼B

1.4.7.2 *Páření generace F_1*

U páření zvířat generace F_1 se za účelem produkce generace F_2 po odstavení vybere z každého vrhu alespoň jeden samec a samice pro spáření s jinými zvířaty ze stejné dávkové skupiny, ale z odlišného vrhu. Výběr zvířat z každého vrhu se provede náhodně, pokud nejsou mezi zvířaty z daného vrhu pozorovány žádné výrazné odlišnosti v tělesné hmotnosti nebo vzhledu. V případě zjištěných odlišností se z každého vrhu vyberou nejkvalitnější jedinci. Z hlediska pragmatického by bylo nejlepší tento výběr provádět na základě tělesné hmotnosti, vhodnějším se však může jevit výběr na základě vzhledu. Potomstvo generace F_1 by se nemělo pářit před dosažením plné pohlavní zralosti.

Páry bez potomstva je třeba vyšetřit za účelem zjištění skutečné příčiny neplodnosti. Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

1.4.7.3 *Druhé páření*

V určitých případech, např. u odchylek velikosti vrhu spojených s aplikací nebo při zjištění nejednoznačného účinku po prvním páření, se doporučuje opětovné připuštění dospělých zvířat z generace P a F_1 za účelem produkce druhého vrhu. Rovněž se doporučuje znovu připustit samice nebo samce, u kterých nedošlo k produkci mláďat s osvědčeným zvířaty. Pokud je u jakékoliv generace nezbytná produkce druhého vrhu, zvířata budou opakovaně připuštěna přibližně jeden týden po odstavení posledního vrhu.

1.4.7.4 *Velikost vrhu*

Zvířatům se ponechá možnost normálně vrhnout a pečovat o svoje potomstvo až do jeho odstavení. Standardizace velikosti vrhů je dobrovolná. Pokud se standardizace provádí, je nutné používanou metodu detailně popsat.

1.5 POZOROVÁNÍ

1.5.1 **Klinická pozorování**

Všeobecné klinické pozorování se provádí denně a v případě podávání látky žaludeční sondou časový rozvrh zohlední očekávané doby nejvyšších účinků po podání látky. Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Alespoň jednou týdně se u každého zvířete provede další podrobnější vyšetření, nejlépe v době vážení zvířete. Dvakrát denně, během víkendu případně jednou denně, se provádí pozorování nemocnosti a úmrtnosti všech zvířat.

▼B

1.5.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody u rodičovských zvířat**

Rodičovská zvířata (generace P a F_1) se zváží v první den podávání látky a poté alespoň jednou týdně. Samice rodičovské generace (P a F_1) se zváží 0., 7., 14. a 20. nebo 21. den gestace, během stejných dnů v průběhu laktace, při vážení vrhů a poté v den utracení zvířat. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete. V období před pářením a během gestačního období se spotřeba potravy měří minimálně každý týden. Pokud se látka podává ve vodě, měří se spotřeba vody alespoň jednou týdně.

1.5.3 **Estrální cyklus**

Před pářením a popřípadě i během páření se u samic generace P a F_1 hodnotí délka a normálnost estrálního cyklu pomocí vaginálních stěrů, dokud se nezíská důkaz o zabřeznutí. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně také nevyvolat stav falešné březosti (1).

1.5.4 **Parametry spermatu**

U všech samců generace P a F_1 se po utracení zaznamená hmotnost varlat a nadvarlat a jeden z každého orgánu se ponechá pro histopatologické vyšetření (viz body 1.5.7, 1.5.8.1). Zbylá varlata a nadvarlata z podskupiny alespoň deseti samců z každé generace P a F_1 se použijí pro výpočet homogenizačně odolných spermatid a kaudálních epididymálních rezerv spermií. Od stejné podskupiny samců se shromáždí spermie z kaudálních částí nadvarlat nebo spermie z chámovodů za účelem vyhodnocení jejich motility a morfologie. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací látky anebo jsou z jiných studií k dispozici důkazy o možném účinku na spermatogenezi, provede se hodnocení spermatu u všech samců z každé skupiny podle dávky; jinak se výpočet omezí pouze na samce z kontrolní skupiny a ze skupiny generace P a F_1 s vysokou dávkou.

Vypočítá se celkový počet homogenizačně odolných testikulárních spermatid a spermií z kaudální části nadvarlat (2, 3). Kaudální rezervy spermií lze odvodit z koncentrace a objemu spermií v suspenzi používané k doplnění kvalitativních hodnocení a počtu spermií získaných pomocí následného rozřezání a/nebo homogenizování zbylé kaudální tkáně. Pokud nejsou zhotoveny digitální záznamy nebo videozáznamy anebo nejsou-li vzorky zmraženy a analýza provedena později, je nutné výpočet u vybrané podskupiny samců ze všech dávkových skupin provést okamžitě po utracení zvířat. v těchto případech se nejprve provádí analýza u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. vliv na počet, motilitu nebo morfologii spermií), není nutné provádět analýzu u ostatních dávkových skupin. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

▼B

Motilita epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) se vyhodnotí nebo zaznamená na video okamžitě po utracení. V takovém případě je nutné vyhodnotit rovněž skupiny s nižší úrovní dávek. Spermie se odeberou tak, aby došlo k minimálnímu poškození, a pomocí vhodných metod se zředí pro analýzu motility (4). Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně. Pokud se provádí počítačová analýza pohyblivosti (5, 6, 7, 8, 9, 10), spočívá odvození progresivní motility v mezních uživatelsky nastavených hodnotách průměrné rychlosti dráhy a přímosti nebo lineárního koeficientu. Pokud se pořídí videozáznam vzorků (11) anebo jsou zobrazení během pitvy zaznamenána jiným způsobem, stačí provést následnou analýzu pouze u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou u samců z generací P a F_1, pokud nedojde ke zjištění účinků spojených s aplikací. Pokud nejsou k dispozici žádné digitální záznamy ani videozáznam, analyzují se pitvou všechny vzorky od všech experimentálních skupin.

Provede se morfologické hodnocení vzorků epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů). Spermie (minimálně 200 na vzorek) se vyšetří jako stabilní, mokré preparáty (12) a klasifikují se jako normální nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií by měly zahrnovat syntézu, izolované a zdeformované hlavičky a/nebo ocásky. Hodnocení se provádí u vybraných podskupin samců ze všech skupin podle úrovní dávek bezprostředně po utracení zvířat, nebo později na základě digitálních záznamů nebo videozáznamů. Jsou-li stěry zakonzervované, lze je rovněž vyhodnotit později. V takovém případě se analyzuje nejprve kontrolní skupina a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. účinek na morfologii spermií), není nutné analyzovat ostatní dávkové skupiny. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Pokud již byly kterékoliv výše zmíněné parametry spermií zkoumány v rámci nejméně 90 dnů trvající studie systémové toxicity, není nutné je v rámci dvougenerační studie opakovat. Doporučuje se však veškeré vzorky nebo digitální záznamy spermií z generace P uchovat pro pozdější hodnocení.

1.5.5 **Potomstvo**

Vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (v nultý den laktace), aby bylo možné stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v den 0, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti (nejsou-li rozložená) a posléze se uchovají. Živá mláďata se spočítají, každé se ihned po narození zváží (v nultý den laktace) nebo během 1. dne a poté v pravidelných intervalech, např. v 4., 7., 14., a 21. den laktace. Zaznamenají se fyzické nebo behaviorální abnormality zjištěné u samic nebo jejich potomstva.

▼B

Fyzický vývoj u potomstva se zaznamenává hlavně podle přírůstku tělesné hmotnosti. Další fyzické parametry (např. otevření uší a očí, prořezávání zubů, růst srsti) mohou poskytnout doplňkové informace, ale u těchto údajů se dává přednost hodnocení v kontextu údajů o pohlavní zralosti (např. stáří a tělesná hmotnost při vaginálním otevření nebo odpojení předkožky) (13). Doporučuje se provést funkční vyšetření (např. pohybová aktivita, smyslové funkce, reflexní ontogeneze) potomstva generace F_1 před a/nebo po odstavení, a to zvláště vyšetření týkající se pohlavní zralosti, nejsou-li taková vyšetření součástí samostatných studií. U odstavených potomků generace F_1 vybraných k připuštění je třeba stanovit stáří, ve kterém došlo k vaginálnímu otevření a odloučení předkožky. U mláďat generace F_2 je třeba změřit anogenitální vzdálenost během postnatálního dne 0, je-li vyvolána změnami v poměru pohlaví u generace F_1 nebo načasováním pohlavní zralosti.

Funkční sledování lze vynechat u skupin, které jinak vykazují jasné známky nepříznivých účinků (např. významné snížení přírůstku hmotnosti atd.). Pokud se provádí funkční vyšetření, nemělo by se provádět u mláďat vybraných k páření.

1.5.6 **Celková pitva**

Po utracení nebo uhynutí během studie se všechna zvířata rodičovské generace (P a F_1), všechna mláďata se zevními odchylkami nebo klinickými známkami a rovněž jedno náhodně vybrané mládě z každého pohlaví a vrhu z obou generací F_1 a F_2 makroskopicky vyšetří na jakékoliv strukturální abnormality anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčiny uhynutí. Mláďata se uchovají.

Děloha všech samic prvorodiček se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

1.5.7 **Hmotnost orgánů**

V okamžiku utracení se u všech rodičovských zvířat generace P a F_1 stanoví tělesná hmotnost a hmotnost těchto orgánů (párové orgány je třeba vážit jednotlivě):

— děloha, vaječníky,

— varlata, nadvarlata (celkem a kaudální),

— prostata,

— semenné váčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami a s prostatou (jako jedna jednotka),

— mozek, játra, ledviny, slezina, hypofýza, štítná žláza a nadledvinky a známé cílové orgány.

U mláďat generace F_1 a F_2 vybraných k pitvě se stanoví tělesná hmotnost v okamžiku utracení. U jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu (viz odstavec 1.5.6) se zváží tyto orgány: mozek, slezina a brzlík.

▼B

Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislost s výsledky zjištěnými v jiných studiích opakovaného dávkování.

1.5.8 **Histopatologie**

1.5.8.1 *Rodičovská zvířata*

Pro histopatologické vyšetření se připraví a ve vhodném prostředí uchovají tyto orgány a tkáně rodičovských zvířat, nebo jejich reprezentativní vzorky:

— vagina, děloha s děložním hrdlem a vaječníky (uložené ve vhodném konzervačním prostředku),

— jedno varle (uložené v Bouinově roztoku nebo jiném srovnatelném prostředku), jedno nadvarle, semenné váčky, prostata a koagulační žláza,

— již dříve určený cílový orgán nebo orgány od všech zvířat generace P a F_1 vybraných k páření.

U všech zvířat generace P a F_1 ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny vybraných k páření se provede kompletní histopatologické vyšetření všech výše vyjmenovaných uchovaných orgánů a tkání. Vyšetření vaječníků u zvířat generace P není povinné. Provede se rovněž vyšetření orgánů vykazujících změny spojené s aplikací látky u zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, které mohou napomoci stanovit dávku NOAEL. Histopatologické vyšetření se navíc provede u reprodukčních orgánů zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, zplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií. Vyšetří se všechny makroskopické léze, jako např. atrofie nebo tumory.

Za účelem zjištění účinků spojených s aplikací, jako jsou např. nevyvinuté spermatidy, chybějící vrstva nebo typ zárodečných buněk, mnohojaderné obří buňky nebo rozrušení spermatických buněk v dutině, se provede podrobné histopatologické vyšetření varlat (např. pomocí Bouinova roztoku, zalití do parafínu a příčných řezů o tloušťce 4–5 μm) (14). Vyšetření intaktního nadvarlete by mělo zahrnovat vyšetření hlavy, těla a kaudální části, čehož lze dosáhnout vyhodnocením podélného řezu. U nadvarlete se vyšetří leukocytová infiltrace, změna v prevalenci typů buněk, aberantní typy buněk a fagocytóza spermií. k vyšetření samčí rozmnožovací soustavy lze použít PAS a hematoxylin.

Postlaktační vaječník by měl obsahovat původní a rostoucí folikuly a rovněž zvětšená žlutá tělíska z období laktace. Histopatologické vyšetření by mělo odhalit kvalitativní snížení celkového počtu původních folikulů. U samic generace F_1 se provede kvantitativní vyhodnocení původních folikulů. K vyhodnocení použitého postupu je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječníků a velikost vzorků řezů. S cílem umožnit srovnání vaječníků u testované a kontrolní skupiny by mělo vyšetření zahrnovat výpočet počtu původních folikulů, které lze zkombinovat s malými rostoucími folikuly (15, 16, 17, 18, 19).

▼B

1.5.8.2 *Odstavená mláďata*

Pro histopatologické vyšetření se ve vhodném prostředí připraví a uchová makroskopicky abnormální tkáň a cílové orgány od všech mláďat se zevními odchylkami nebo klinickými příznaky a rovněž od jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu z obou generací F_1 a F_2, které nebyly vybrány k páření. Kompletní histopatologická charakterizace uchovaných tkání se provede se speciálním důrazem na orgány rozmnožovací soustavy.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny a každé generace uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, typy pozorování rodičovských zvířat a jejich potomstva a všechny významné údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí pomocí vhodné, všeobecně uznávané statistické metody; metody se zvolí v rámci návrhu studie a je třeba je zdůvodnit. Pro analýzu dat je vhodné použít statistické modely dávka-odezva. Protokol by měl obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat nezávislý statistik.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky této dvougenerační studie reprodukční toxicity se vyhodnotí ve vztahu k pozorovaným účinkům včetně pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uvedeno, zda existuje nebo neexistuje souvislost mezi dávkou zkoušené látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí stanovených cílových orgánů, vlivu na plodnost, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky. Při hodnocení výsledků zkoušky se přihlédne k fyzikálně-chemickým vlastnostem zkoušené látky a toxikokinetickým údajům, jsou-li k dispozici.

Správně provedená zkouška reprodukční toxicity by měla zajistit dostačující odhad úrovně dávky bez účinku a vysvětlení nepříznivých účinků na reprodukci, vrh, laktaci, postnatální vývoj včetně růstu a pohlavního vývoje.

▼B

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Dvougenerační studie reprodukční toxicity poskytne informace o účinku opakované expozice látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčních parametrech a o vývoji, růstu, dozrávání a přežívání potomstva. Výsledky studie se interpretují v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Výsledky této studie lze použít k posouzení potřeby dalšího zkoušení chemické látky. Extrapolace výsledků této studie na člověka platí pouze v omezené míře. Největší význam těchto výsledků spočívá v tom, že poskytují informace o úrovni dávky bez účinků a o přípustné expozici člověka (20, 21, 22, 23).

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální vlastnosti, a je-li to podstatné, též fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o složení zkoušené látky/krmiva, o dosažené koncentraci,

— stabilita a homogenita přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

▼B

Výsledky:

— spotřeba stravy a vody, jsou-li k dispozici, využití stravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy) a spotřeba zkoušené látky u zvířat generace P a F_1 s výjimkou období kohabitace a minimálně poslední třetiny laktace,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat z generace P a F_1 vybraných k páření,

— údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (vratných i nevratných),

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— údaje o toxické reakci podle pohlaví a dávky, včetně koeficientů páření, plodnosti, gestace, porodnosti, životaschopnosti a laktace; zpráva by měla uvádět údaje využité při výpočtu těchto koeficientů,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.;

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— počet samic s normálním cyklem z generace P a F_1 a délka cyklu,

— celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými abnormalitami,

— doba do páření včetně počtu dnů před pářením,

— délka gestace,

— počet implantátů, žlutých tělísek, velikost vrhu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami a počet zakrslých mláďat, pokud byl zjišťován,

— údaje o fyzických vývojových znacích u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji; hodnocené fyzické vývojové znaky je nutno zdůvodnit,

— případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

▼B

Rozbor výsledků.

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na samice a potomstvo.

4. **LITERATURA**

1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12; 92–108.

3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54; 103–107.

4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5; 39–44

5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3); 237–244.

6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6; 267–273

7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13; 409–421.

8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5; 449–458.

9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida; s. 319–333.

10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10; 401–415.

11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8; 330–337.

12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6; 491–505.

13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17; 298–303.

14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, s. 421–426.

17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5; 379–383.

19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOXIKOKINETIKA**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 417 (2010). Studie zkoumající toxikokinetiku (TK) zkoušené chemické látky se provádí za účelem získání náležitých informací o její absorpci, distribuci, biotransformaci (tj. metabolismu) a exkreci, které pomohou dát do souvislosti koncentraci či dávku s pozorovanou toxicitou a pomohou pochopit mechanismus její toxicity. Toxikokinetika může pomoci porozumět TK studiím tím, že prokáže, že jsou pokusná zvířata systémově vystavena zkoušené chemické látce a odhalením identity cirkulujících složek (mateřská chemická látka/metabolity). Základní TK parametry stanovené v těchto studiích rovněž poskytnou informace o schopnosti zkoušené chemické látky hromadit se v tkáních a/nebo orgánech a o schopnosti vyvolat biotransformaci v důsledku expozice zkoušené chemické látce.

2. TK údaje mohou přispět k posouzení přijatelnosti a relevantnosti použití údajů o toxicitě u zvířat k extrapolaci na nebezpečnost pro člověka a/nebo posouzení rizik. Dále mohou toxikokinetické studie poskytnout užitečné informace pro stanovení úrovní dávek ve studiích toxicity (lineární vs. nelineární kinetika), účinků cesty podání, biologické dostupnosti a otázek souvisejících s uspořádáním studie. Určité druhy TK údajů lze použít k vývoji modelu toxikokinetiky na fyziologické bázi (PBTK).

3. Údaje o metabolitech/TK údaje jsou důležité např. k navržení možných toxických účinků a způsobů účinků a jejich vztahu k úrovni dávky a k cestě expozice. Dále mohou údaje o metabolismu poskytnout užitečné informace pro posouzení toxikologického významu expozic exogenně produkovaných metabolitů zkoušené chemické látky.

4. Náležité toxikokinetické údaje pomohou zajistit další přijatelnost a uplatnitelnost kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou, analogických přístupů či přístupů založených na seskupování, při hodnocení bezpečnosti chemických látek. Údaje o kinetice lze rovněž použít k zhodnocení toxikologické relevantnosti jiných studií (např. *in vivo*/*in vitro*).

5. Není-li uvedena jiná cesta podání (viz zejména odstavce 74–78), používá se tato zkušební metoda při orálním podávání zkoušené chemické látky.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Regulační systémy mají u různých tříd chemických látek (např. pesticidy, biocidy, průmyslové chemikálie) různé požadavky a potřeby týkající se měření cílových parametrů souvisejících s toxikokinetikou. Na rozdíl od většiny zkušebních metod tato zkušební metoda popisuje zkoušky toxikokinetiky, což zahrnuje více měření a cílových parametrů. V budoucnosti může být vyvinuto nové zkušební metody a/nebo pokyny, které budou popisovat každý cílový parametr samostatně a podrobněji. V případě této zkušební metody jsou zkoušky či vyhodnocení, které se mají provést, určeny podle požadavků a/nebo potřeb každého regulačního systému.

▼M4

7. Existuje řada studií, které lze provést ke zhodnocení TK chování zkoušené chemické látky pro regulační účely. Nicméně v závislosti na konkrétních regulačních potřebách nebo situacích nemusí být všechny tyto studie pro hodnocení zkoušené chemické látky nutné. Při plánování toxikokinetických studií je nutná flexibilita a zohlednění hodnocených vlastností zkoušené chemické látky. V některých případech je třeba prozkoumat pouze určitou sadu otázek, aby se zhodnotila nebezpečnost a obavy z rizik související se zkoušenou chemickou látkou. V některých situacích se mohou TK údaje shromáždit jako součást hodnocení v jiných toxikologických studiích. V jiných situacích může být nutné provést doplňující a/nebo rozsáhlejší studie TK, v závislosti na regulačních potřebách a/nebo pokud se při hodnocení zkoušené chemické látky objeví nové otázky.

8. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce a příslušných metabolitech a analozích, aby se zvýšila kvalita studie a předešlo se zbytečnému použití zvířat. Tyto informace mohou obsahovat údaje z ostatních relevantních zkušebních metod (studie *in vivo*, studie *in vitro* a/nebo hodnocení *in silico*). K plánování studie a interpretaci výsledků mohou být užitečné fyzikálně-chemické vlastnosti, jakými jsou rozdělovací koeficient oktanol–voda (vyjádřený jako log P_{ow}), pKa, rozpustnost ve vodě, tlak par a molekulová hmotnost chemické látky. Lze je stanovit pomocí vhodných metod, jak je popsáno v příslušných zkušebních metodách.

OMEZENÍ

9. Tato zkušební metoda není určena pro speciální okolnosti, např. březí zvířata nebo zvířata v laktaci a mláďata, či k hodnocení potenciálních reziduí u exponovaných zvířat chovaných pro potravinářské účely. Nicméně údaje získané ze studie B.36 mohou poskytnout podkladové informace, které mohou být vodítkem při plánování speciálních studií pro tyto výzkumy. Tato zkušební metoda není určena pro zkoušky nanomateriálů. Ze zprávy o předběžném přezkoumání Pokynů OECD ke zkouškám s ohledem na jejich použitelnost u nanomateriálů vyplývá, že pokyny TG 417 (odpovídající této zkušební metodě B.36) není možné v případě nanomateriálů použít (1).

DEFINICE

10. Definice použité pro účely této zkušební metody jsou uvedeny v dodatku.

ÚVAHY O ZAJIŠTĚNÍ DOBRÝCH ŽIVOTNÍCH PODMÍNEK ZVÍŘAT

11. Pokyny k humánnímu zacházení se zvířaty jsou k dispozici v Pokynech OECD (GD) 19 (2). U všech studií *in vivo* a *in vitro* popsaných v této zkušební metodě se doporučuje postupovat podle dokumentu OECD GD 19.

POPIS METOD

Pilotní studie

12. Při výběru experimentálních parametrů pro studie toxikokinetiky (např. metabolismu, látkové bilance, analytických postupů, stanovení dávky, vydechovaného CO_2 atd.) se doporučuje použít pilotní studie. K charakterizaci některých z těchto parametrů nemusí být nutné používat radioizotopově značené chemické látky.

▼M4

Výběr zvířat

Druhy

13. Zvířecí druh (a kmen) použitý pro zkoušky TK by měl být nejlépe stejný jako druh použitý v jiných toxikologických studiích prováděných s danou zkoušenou chemickou látkou. Obvykle by se měl použít potkan, neboť se v toxikologických studiích široce používá. Použití jiných nebo doplňkových druhů může být oprávněné, pokud kritické toxikologické studie prokážou výskyt významné toxicity u těchto druhů nebo pokud se ukáže, že toxicita/toxikokinetika těchto druhů je pro člověka relevantnější. Výběr zvířecího druhu a kmene by se měl zdůvodnit.

14. Není-li uvedeno jinak, týká se tato zkušební metoda potkana jakožto zkoušeného druhu. Pokud jsou ke zkouškám použity jiné druhy, může být nutné určité aspekty této metody upravit.

Stáří a kmen

15. Měla by se použít mladá dospělá zvířata (v době podávání dávky obvykle 6–12 týdnů stará) (viz také odstavce 13 a 14). Použití zvířat, která nejsou mladá a dospělá, by se mělo zdůvodnit. Všechna zvířata by měla být na počátku studie přibližně stejného stáří. Odchylky v hmotnosti jednotlivých zvířat by v dané experimentální skupině neměly překročit ± 20 % průměrné hmotnosti. V ideálním případě by se měl použít stejný kmen, jaký se použil při získávání toxikologických dat o dané zkoušené chemické látce.

Počet a pohlaví zvířat

16. Pro každou zkoumanou dávku by se měla použít alespoň čtyři zvířata od každého pohlaví. Mělo by se uvést zdůvodnění pro výběr pohlaví použitých zvířat. Jestliže existují důkazy, které svědčí o významných rozdílech v toxicitě v závislosti na pohlaví, mělo by se použití obou pohlaví (čtyř samců a čtyř samic) uvážit.

Podmínky chovu a krmení

17. Zvířata by se měla v průběhu zkoušky chovat jednotlivě. Za speciálních podmínek může být odůvodněn skupinový chov. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C) a relativní vlhkost 30–70 %. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody.

Zkoušená chemická látka

18. Pro látkovou bilanci a identifikaci metabolitů ve studii by se měla použít radioizotopově značená zkoušená chemická látka (pomocí ^{14}C), avšak je-li možné prokázat, že:

— látkovou bilanci a identifikaci metabolitů lze dostatečně vyhodnotit i při použití neznačené zkoušené chemické látky,

— analytická specifičnost a citlivost metody použité s neznačenou zkoušenou chemickou látkou je shodná nebo větší, než jaké by bylo možné dosáhnout s radioizotopově značenou zkoušenou chemickou látkou,

▼M4

pak se radioizotopově značená chemická látka nemusí používat. Kromě toho lze použít jiné radioaktivní a stabilní izotopy, zejména pokud je příslušný prvek zodpovědný za toxicitu nebo je součástí toxické části zkoušené chemické látky. Je-li to možné, měla by být radioaktivní značka umístěna ve středové části molekuly, která je metabolicky stabilní (není zaměnitelná, nelze ji metabolicky odbourat jako CO_2 a nestává se součástí zásob jednouhlíkových jednotek v organismu). Někdy může být nutné označit více míst nebo specifických oblastí molekuly, aby bylo možné sledovat metabolický osud zkoušené chemické látky.

19. Pomocí vhodných metod by se měla stanovit čistota a identita radioizotopově značených a neznačených zkoušených chemických látek. Radiochemická čistota radioaktivní zkoušené chemické látky by měla být nejvyšší, jaké lze u dané zkoušené chemické látky dosáhnout (v ideálním případě by měla být větší než 95 %) a mělo by se vynaložit dostatečné úsilí k identifikaci nečistot přítomných v množství 2 % a větším. Čistota spolu s identitou a procentuálním zastoupením jakýchkoli nečistot, které byly identifikovány, by se měla zaznamenat. Další užitečné pokyny při definování a specifikacích zkoušených chemických látek, které jsou složeny ze směsí, a metody pro stanovení čistoty mohou být obsaženy v individuálních regulačních programech.

Výběr dávky

Pilotní studie

20. Pro pilotní studii je obvykle dostačující jednorázová orální dávka. Dávka by měla být netoxická, avšak dostatečně vysoká na to, aby umožnila identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě) a rovněž aby splňovala uvedený účel pilotní studie, jak je uveden v odstavci 12 této zkušební metody.

Hlavní studie

21. Pro hlavní studie se upřednostňují minimálně dvě dávky, neboť informace získané alespoň ze dvou exponovaných skupin mohou pomoci při nastavování dávek v jiných studiích toxicity a při hodnocení vztahu mezi dávkou a odezvou v již dostupných zkouškách toxicity.

22. Pokud se podávají dvě dávky, měly by být obě dostatečně vysoké, aby umožnily identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě). Při výběru dávky by se měly vzít v úvahu dostupné toxikologické údaje. Nejsou-li tyto informace k dispozici (např. ze studií akutní orální toxicity zaznamenávajících příznaky toxicity nebo ze studií toxicity po opakovaných dávkách), může se zvážit použití vyšší dávky, která je menší než odhad LD_{50} (orální a dermální cesta) nebo LC_{50} (inhalační cesta) nebo menší než nižší hodnota odhadovaného rozmezí akutní toxicity. Nižší dávka by se měla stanovit vydělením vyšší dávky.

23. Jestliže se zkoumá pouze jedna úroveň dávky, měla by být dávka v ideálním případě dostatečně vysoká, aby umožnila identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě), aniž by vedla ke zjevné toxicitě. Mělo by se uvést zdůvodnění, proč nebyla zařazena druhá úroveň dávky.

24. Jestliže je třeba stanovit účinek dávky na kinetické procesy, nemusí být dvě dávky dostačující a alespoň jedna dávka by měla být dostatečně vysoká, aby tyto procesy saturovala. Pokud se při dvou úrovních dávky použité v hlavní studii plocha pod křivkou závislosti koncentrace v plazmě na čase (AUC) nemění lineárně, svědčí to o tom, že k saturaci jednoho nebo více kinetických procesů dochází někde mezi těmito dvěma úrovněmi dávek.

▼M4

25. U zkoušených chemických látek s nízkou toxicitou (podávaných orálně a dermálně) by se měla použít maximálně dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti (pokud se látka podává inhalační cestou, viz pokyny v kapitole B.2 této přílohy; obvykle tato dávka nepřesahuje 2 mg/l). Úvahy specifické pro danou chemickou látku mohou vyžadovat vyšší dávku v závislosti na potřebách regulačních opatření. Výběr dávky by měl být vždy zdůvodněn.

26. Údaje o toxikokinetice a distribuci látky v tkáních po jednorázové dávce mohou být dostačující pro stanovení potenciálu akumulace a/nebo perzistence. Nicméně za určitých okolností může být třeba podávat dávku opakovaně i) aby bylo úplnější zhodnocení potenciálu akumulace a/nebo perzistence či změny v TK (tj. například indukce a inhibice enzymů) nebo ii) protože to vyžaduje příslušný regulační systém. Ve studiích s opakovaným podáváním dávky obvykle postačí opakované podávání nízké dávky, avšak za jistých okolností může být nutné podávat opakovaně vysokou dávku (viz také odstavec 57).

Podávání zkoušené chemické látky

27. Pokud je známo, jaký nosiči byl použit pro studie orální toxicity s danou chemickou látkou podávanou nitrožaludečně, měla by se zkoušená chemická látka rozpustit nebo homogenně suspendovat ve stejném nosiči. Mělo by se uvést zdůvodnění výběru nosiče. Výběr nosiče a objemu dávkování by se měl zvážit v návrhu studie. Obvyklým způsobem podání je žaludeční sonda, avšak ve speciálních případech může být výhodné podávat látku ve formě želatinové tobolky nebo ve směsi s potravou (v obou případech je třeba uvést zdůvodnění). Mělo by se uvést ověření skutečné dávky podané každému zvířeti.

28. Maximální objem tekutiny, který se podává najednou žaludeční sondou, závisí na velikosti pokusného zvířete, druhu nosiče dávky a na skutečnosti, zda je před podáním zkoušené chemické látky pozastaveno krmení či nikoli. Mělo by se uvést zdůvodnění pro podávání nebo omezení krmiva před podáním dávky. Objem dávky by měl být za běžných okolností co možná nejnižší, až už se použijí vodné nebo jiné nosiče. Objemy dávky by u hlodavců obvykle neměly přesáhnout 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Objemy nosičů použitých pro lipofilnější zkoušené chemické látky mohou začínat na 4 ml/kg tělesné hmotnosti. Při opakovaném podávání dávky, kdy je lačnění přes den kontraindikováno, by se mělo uvažovat o nižších objemech dávky (např. 2–4 ml/kg tělesné hmotnosti). Kdykoli je to možné, může se zvážit použití stejného objemu dávky, jaký byl podáván žaludeční sondou v jiných orálních studiích zkoušené chemické látky.

29. K stanovení biologické dostupnosti nebo relativní orální absorpce je možné použít nitrožilní (intravenózní, IV) podání zkoušené chemické látky a měření hladiny zkoušené chemické látky v krvi a/nebo exkretech. V případě IV studie se podává jednorázová dávka (obvykle odpovídající nižší orální dávce, avšak ji nepřesahující – viz výběr dávky) zkoušené chemické látky s pomocí vhodného nosiče. Tento materiál by se měl podávat ve vhodném objemu (např. 1 ml/kg tělesné hmotnosti) na vybraném místě podání alespoň čtyřem zvířatům vhodného pohlaví (je-li to potřeba, mohou se použít obě pohlaví, viz odstavec 16). K podání zkoušené chemické látky intravenózně je nutné, aby byla dávka plně rozpuštěna nebo suspendována. Nosič použitý při IV podání by neměl ovlivňovat integritu krve ani krevní tok. Jestliže se zkoušená chemická látka podává infuzí a používá-li se infuzní pumpa, měla by se uvést infuzní rychlost a měla by

▼M4

být standardizována pro všechna zvířata. Je-li zaváděna kanyla do *vena jugularis* (k podání zkoušené chemické látky a/nebo odběru krve) nebo podává-li se látka do *arteria femoralis*, měla by se použít anestézie. Druh anestézie je třeba náležitě zvážit, neboť může ovlivnit toxikokinetiku. Zvířatům by se měl ponechat dostatek času na náležité zotavení před podáním zkoušené chemické látky a nosiče.

30. Ostatní cesty podání, např. dermální a inhalační (viz odstavce 74–78), se mohou použít u určitých druhů zkoušených chemických látek s ohledem na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a očekávané použití nebo expozici u člověka.

Měření

Látková bilance

31. Látková bilance se stanoví sečtením procentuálního zastoupení podané (radioaktivní) dávky, která se vyloučila močí, výkaly a vydechovaným vzduchem, a procentuálního zastoupení v tkáních, zbývajících částech mrtvého těla a ve zbytcích vymytých z klece (viz odstavec 46). Obvykle se považují celkové výtěžky podané chemické látky (radioaktivní) nad 90 % za dostatečné.

Absorpce

32. Úvodní odhad absorpce lze stanovit tak, že se z látkové bilance odečte procentuální zastoupení dávky v gastrointestinálním (GI) traktu a/nebo výkalech. Výpočet procentuální absorpce uvádí odstavec 33. Vyšetření exkretů uvádí odstavce 44–49. Nelze-li ze studií látkové bilance určit přesnou míru absorpce po orálním podání dávky (např. když je více než 20 % podané dávky přítomno ve výkalech), může být nezbytné provést další vyšetření. Tyto studie se mohou zahrnovat buď 1) orální podání zkoušené chemické látky a měření obsahu zkoušené chemické látky ve žluči, nebo 2) orální a IV podání zkoušené chemické látky a měření čistého množství zkoušené chemické látky přítomné v moči a vydechovaném vzduchu a v mrtvém těle při každé z těchto dvou cest. V obou plánech studie se provádí měření radioaktivity jako náhradní metoda za chemicky specifickou analýzu zkoušené chemické látky a metabolitů.

33. Provádí-li se studie exkrece žlučí, používá se obvykle orální cesta podání. V této studii by se měly kanylovat žlučovody alespoň čtyř zvířat vhodného pohlaví (nebo obou pohlaví, je-li to opodstatněné) a měla by se jim podat jednorázová dávka zkoušené chemické látky. Po podání zkoušené chemické látky by se měla sledovat exkrece radioaktivní/zkoušené chemické látky ve žluči tak dlouho, jak je potřeba pro určení procentuálního podílu podané dávky, který se vylučuje touto cestou a který lze použít k přímému výpočtu míry orální absorpce takto:

$$\text{Procentuální absorpce} = \frac{(\text{množství ve žluči} + \text{moči} + \text{vydechovaném vzduchu} + \text{mrtvém těle bez obsahu GItraktu})}{\text{podané množství}} \times 100$$

34. U některých tříd zkoušených chemických látek může dojít k přímé sekreci absorbované dávky přes střevní stěnu. V takových případech se měření % dávky ve výkalech po orálním podání dávky u potkana s kanylovanými žlučovody nepovažuje za odpovídající neabsorbované dávce. Doporučuje se, aby se v případě, kdy podle předpokladů dochází k sekreci látky ze střev, zakládalo stanovení % absorbované dávky na absorpci vypočítané ze srovnání exkrece po orální a IV cestě podání (potkan s kanylovanými žlučovody nebo intaktní) (viz odstavec 35). Rovněž se doporučuje, aby se v případě, kdy se považuje za nutné kvantifikovat střevní sekreci, měřila exkrece u potkana s kanylovanými žlučovody po IV podání dávky.

▼M4

Biologická dostupnost

35. Biologickou dostupnost lze stanovit z kinetiky látky v plazmě/krvi u skupin s orálním a IV podáním, jak popisují odstavce 50–52, specifickou chemickou analýzou zkoušené chemické látky a/nebo příslušného metabolitu (příslušných metabolitů), a radioizotopově značená zkoušená chemická látka proto není nutná. Výpočet biologické dostupnosti (F) zkoušené chemické látky nebo příslušného metabolitu (příslušných metabolitů) lze provést následovně:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dávka_{IV}/Dávka_{exp})$$

kde AUC je plocha pod křivkou závislosti koncentrace v plazmě na čase a exp je experimentální cesta podání (orální, dermální nebo inhalační).

36. K posouzení rizika systémových účinků se obvykle upřednostňuje použití biologické dostupnosti toxické složky před procentuální absorpcí, když se porovnávají systémové koncentrace ze studií na zvířatech s analogickými údaji z biomonitorování ve studiích expozice pracovníků. Situace se může stát složitější, pokud se dávky nacházejí v nelineárním rozmezí, proto je důležité, aby se při toxikokinetickém screeningu stanovily dávky v lineárním rozmezí.

Distribuce v tkáních

37. Poznatky o distribuci zkoušené chemické látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních jsou důležité pro identifikaci cílových tkání a pochopení základních mechanismů toxicity a pro získání informací o schopnosti akumulace a perzistence zkoušené chemické látky a jejích metabolitů. Procentuální podíl celkové (radioaktivní) dávky v tkáních a rovněž ve zbylém mrtvém těle by se měl měřit alespoň při ukončení exkrečního experimentu (např. obvykle do 7 dnů či méně po podání dávky v závislosti na specifickém chování zkoušené chemické látky). Pokud při ukončení studie není v tkáních detekována žádná zkoušená chemická látka (např. protože mohlo k její eliminaci dojít ještě před ukončením studie v důsledku krátkého eliminačního poločasu), je třeba důsledně předcházet nesprávné interpretaci údajů. V takové situaci by se měla distribuce v tkáních vyšetřit v době maximální koncentrace zkoušené chemické látky (a/nebo metabolitu) v plazmě/krvi (T_{max}) nebo v době maximální míry exkrece látky močí dle vhodnosti (viz odstavec 38). Kromě toho může být potřeba odebrat tkáň ještě v dalších časových bodech k stanovení distribuce zkoušené chemické látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních, zhodnocení závislosti na čase (je-li vhodné), pomoci při stanovení látkové bilance a/nebo na základě požadavků příslušného orgánu. Mezi tkáně, které by se měly odebrat, patří játra, tuková tkáň, GI trakt, ledviny, slezina, krev jako celek, zbylé části mrtvého těla, tkáně cílových orgánů a jakékoli další tkáně (např. štítná žláza, erytrocyty, reprodukční orgány, kůže, oči – zejména u zvířat s pigmentací), které mohou mít význam při toxikologickém hodnocení zkoušené chemické látky. Měla by se zvážit analýza dalších tkání ve stejných časových bodech za účelem maximálního využití zvířat a v případě, kdy je ve studiích subchronické a chronické toxicity pozorována toxicita vůči cílovým orgánům. Měly by se rovněž uvádět (radioaktivní) zbytkové koncentrace a poměr tkání a plazmy (krví).

38. Zhodnocení distribuce v tkáních v dalších časových bodech, jako je čas maximální koncentrace látky v plazmě/krvi (T_{max}) nebo čas maximální míry exkrece látky močí, v příslušných experimentech zkoumajících kinetiku látky v plazmě/krvi nebo exkreci látky, může být také potřebné nebo jej může vyžadovat příslušný orgán. Tyto informace mohou být užitečné k pochopení toxicity a schopnosti akumulace a perzistence zkoušené chemické látky a jejích metabolitů. Mělo by se uvést zdůvodnění výběru vzorků. Vzorky k analýze by měly být obvykle stejné jako výše zmiňované (viz odstavec 37).

▼M4

39. Kvantifikaci radioaktivity ve studiích distribuce v tkáních lze provést preparací orgánu, homogenizací, spálením a/nebo solubilizací, po čemž následuje kapalinová scintilační spektrometrie (LSC) zachycených reziduí. Při stanovování distribuce zkoušené chemické látky v orgánech a/nebo tkáních mohou být užitečné určité techniky, které jsou v současnosti v různých fázích vývoje, např. kvantitativní celotělová autoradiografie a receptorová mikroskopická autoradiografie (3), (4).

40. U jiných cest expozice než orální by se měly odebrat a analyzovat specifické tkáně, jako jsou plíce v inhalačních studiích a kůže v dermálních studiích. Viz odstavce 74–78.

Metabolismus

41. Pro identifikaci a kvantifikaci nezměněné zkoušené chemické látky a metabolitů by se měly odebrat exkrety (a plazma, je-li to vhodné), jak je popsáno v odstavcích 44–49. Sloučení exkretů v rámci skupiny s danou dávkou k usnadnění identifikace metabolitů je přípustné. Doporučuje se určit profil metabolitů v každém časovém období. Pokud však množství vzorků a/nebo výše radioaktivity nejsou dostatečné, je přípustné sloučit moč a výkaly z několika časových bodů. Slučování vzorků odebraných různým pohlavím nebo při různých dávkách však přípustné není. K analýze moči, výkalů, radioaktivity uvolněné z exponovaných zvířat a případně žluči by se měly použít vhodné kvalitativní a kvantitativní metody.

42. Mělo by se vynaložit dostatečné úsilí k identifikaci všech metabolitů, které představují 5 % množství podané dávky či větším a k vytvoření metabolického schématu zkoušené chemické látky. Měly by se identifikovat zkoušené chemické látky, které byly zjištěny v exkretech v množství 5 % podané dávky a větším,. Identifikací se rozumí přesné určení struktury složek. Obvykle se identifikace provádí simultánní chromatografií metabolitu se známými standardy s použitím dvou rozdílných systémů nebo pomocí technik schopných provést pozitivní identifikaci struktury, jako je hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance (NMR) atd. V případě simultánní chromatografie se chromatografické techniky používající stejnou stacionární fázi se dvěma různými systémy rozpouštědla nepovažují za dostatečnou verifikaci metabolitu dvěma metodami, neboť tyto metody nejsou nezávislé. Identifikace pomocí simultánní chromatografie by se měla provést pomocí dvou rozdílných analyticky nezávislých systémů, jako je například chromatografie na tenké vrstvě (TLC) s reverzní a normální fází a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jestliže je chromatografická separace dostatečně kvalitní, není další potvrzení pomocí spektroskopických postupů nutné. Jednoznačné identifikace lze dosáhnout také pomocí metod podávajících informace o struktuře, jako je kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (LC-MS) nebo kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (GC-MS) a NMR spektrometrie.

43. Jestliže identifikace metabolitů představujících 5 % množství podané dávky a větší není možná, mělo by se v závěrečné zprávě uvést zdůvodnění/vysvětlení. Může být vhodné identifikovat metabolity představující méně než 5 % podané dávky k lepšímu pochopení metabolické dráhy zkoušené chemické látky pro posouzení její nebezpečnosti a/nebo rizik. Kdykoli je to možné, mělo by se uvést potvrzení struktury. To může zahrnovat určení jejího profilu v plazmě, krvi nebo jiných tkáních.

▼M4

Vylučování

44. Rychlost a rozsah vylučování podané dávky by se měly určit měřením procentuální výtěžnosti (radioaktivní) dávky z moči, výkalů a vydechovaného vzduchu. Tyto údaje rovněž pomohou při stanovení látkové bilance. Množství zkoušené chemické látky (radioaktivita) vyloučené v moči, výkalech a vydechovaném vzduchu by se mělo stanovovat ve vhodných časových intervalech (viz odstavce 47–49). Experimenty s opakovaným podáváním dávky by měly být správně navrženy tak, aby umožnily sběr údajů o exkreci ke splnění cílů popsaných v odstavci 26. Umožní to srovnání s experimenty s jednorázovou dávkou.

45. Jestliže pilotní studie prokázala, že se ve vydechovaném vzduchu nevylučuje žádné významné množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) (dle odstavce 49), nemusí se v konečné studii vydechovaný vzduch odebírat.

46. Každé zvíře se musí umístit do oddělené metabolické jednotky pro sběr exkretů (moč, výkaly a vydechovaný vzduch). Na konci každého období sběru (viz odstavce 47–49) by se měly metabolické jednotky vypláchnout vhodným rozpouštědlem (tomu se říká „vymytí klece“) aby se zajistil maximální výtěžek zkoušené chemické látky (radioaktivity). Sběr exkretů by se měl ukončit 7. den nebo poté, co bylo získáno alespoň 90 % podané dávky, podle toho, co nastane dříve.

47. Celková množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) v moči se musí stanovit v 1. den sběru alespoň ve dvou časových bodech, z nichž jeden by měl být 24 h po podání dávky, a poté se stanovují denně až do konce studie. První den se doporučuje zvolit více než dva odběrové časy (např. po 6 h, 12 h a 24 h). Výsledky pilotních studií by se měly analyzovat, aby se získaly informace k určení alternativních nebo doplňujících odběrových časů. Odběrová schémata by měla být zdůvodněna.

48. Celková množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) ve výkalech by se měla stanovovat denně, s prvním odběrem 24 h po podání dávky, až do konce studie, pokud pilotní studie nenavrhuje alternativní nebo doplňující odběrové časy. Alternativní odběrová schémata by měla být zdůvodněna.

49. Sběr vydechovaného CO_2 a dalších těkavých materiálů lze v daném studijním experimentu ukončit, jestliže se během 24hodinového období sběru ve vydechovaném vzduchu nalezne méně než 1 % podané dávky.

Studie časového průběhu

Kinetika v plazmě/krvi

50. Cílem těchto studií je získat odhady základních TK parametrů [např. C_{max}, T_{max}, eliminační poločas ($t_{1/2}$), AUC] zkoušené chemické látky. Tyto studie lze provádět s jednou dávkou nebo – pravděpodobněji – se dvěma a více dávkami. Nastavení dávek by se mělo určit podle podstaty experimentu a/nebo příslušné tkáně. Kinetické údaje mohou být zapotřebí k řešení otázek, jako je biologická dostupnost zkoušené chemické látky a/nebo k objasnění účinku dávky na clearanci (např. k objasnění, zda je clearance saturována způsobem závisejícím na dávce).

51. V těchto studiích by se měla použít nejméně čtyři zvířata jednoho pohlaví pro každou skupinu s příslušnou dávkou. Mělo by se uvést zdůvodnění pro výběr pohlaví použitých zvířat. Použití obou pohlaví (čtyři samci a čtyři samice) by se mělo zvážit, jestliže existují důkazy, které svědčí o významných rozdílech v toxicitě v závislosti na pohlaví.

▼M4

52. Po podání zkoušené chemické látky (radioizotopově značené) by se měly každému zvířeti ve vhodnou dobu odebrat krevní vzorky pomocí náležité metodiky odběru. Objem a množství krevních vzorků, které lze získat od jednoho zvířete, může být limitován potenciálními účinky opakovaného odběru na zdraví/fyziologii zvířete a/nebo citlivostí analytické metody. Vzorky by se měly analyzovat u každého jednotlivého zvířete zvlášť. Za určitých okolností (např. charakterizace metabolitů), může být nutné sloučit vzorky od více než jednoho zvířete. Sloučené vzorky by měly být jasně označené a mělo by se podat zdůvodnění sloučení vzorků. Používá-li se radioizotopově značená zkoušená chemická látka, může být postačující analýza celkové přítomné radioaktivity. Je-li tomu tak, měla by se celková radioaktivita analyzovat v krvi a plazmě nebo v plazmě a červených krvinkách, aby byl možný výpočet podílu látky v krvi/plazmě. V jiných případech mohou být nezbytná specifičtější vyšetření vyžadující identifikaci mateřské sloučeniny a/nebo metabolitů nebo vyhodnocení vazby na proteiny.

Kinetika v dalších tkáních

53. Cílem těchto studií je získat informace o časovém průběhu, aby bylo možno zodpovědět otázky týkající se např. způsobu toxického účinku, bioakumulace a bioperzistence pomocí stanovení hladiny zkoušené chemické látky v různých tkáních. Výběr tkání a počet hodnocených časových bodů bude záviset na příslušné tkáni a na databázi toxikologických údajů o zkoušené chemické látce. Plán těchto studií kinetiky v dalších tkáních by měl brát v úvahu také informace získané postupy popsanými v odstavcích 37–40. Tyto studie mohou používat jednorázové nebo opakované podání dávky. Mělo by se uvést podrobné zdůvodnění použitého postupu.

54. Mezi důvody pro provádění studií kinetiky v dalších tkáních může patřit:

— důkaz prodlouženého eliminačního poločasu v krvi naznačující možnou akumulaci zkoušené chemické látky v různých tkáních nebo

— zájem zjistit, zda bylo v konkrétních tkáních dosaženo ustáleného stavu (např. ve studiích s opakovanými dávkami může být zájem zjistit, zda bylo dosaženo ustáleného stavu v cílových tkáních v okamžiku, kdy bylo zdánlivě dosaženo ustáleného stavu zkoušené chemické látky v krvi).

55. V těchto typech studií sledujících časový průběh by se měla podat příslušná orální dávka zkoušené chemické látky nejméně čtyřem zvířatům pro každou dávku a každý časový bod a ve vybraných tkáních se poté sleduje časový průběh distribuce. Je možno použít pouze jedno pohlaví, pokud nebyla pozorována toxicita specifická pro pohlaví. Zda se bude analyzovat celková radioaktivita nebo mateřská chemická látka a/nebo metabolity bude rovněž záviset na příslušné tkáni. Vyhodnocení distribuce v tkáních by se mělo provádět pomocí vhodných technik.

Enzymová indukce/inhibice

56. Studie sledující možné účinky enzymové indukce/inhibice nebo biotransformace studované zkoušené chemické látky mohou být zapotřebí v jednom nebo více z následujících případů:

1) dostupné důkazy naznačují vztah mezi biotransformací zkoušené chemické látky a zvýšenou toxicitou;

2) dostupné údaje o toxicitě naznačují nelineární vztah mezi dávkou a metabolismem;

▼M4

3) výsledky studií identifikace metabolitů prokázaly identifikaci potenciálně toxického metabolitu, který by mohl být produkován enzymovou drahou indukovanou zkoušenou chemickou látkou;

4) při vysvětlování účinků, o nichž se tvrdí, že jsou spojeny s fenoménem enzymové indukce;

5) jsou-li pozorovány toxikologicky významné změny metabolického profilu zkoušené chemické látky buď v *in vitro,* nebo v *in vivo* experimentech s různými druhy či za různých podmínek, může být potřebná charakterizace zúčastněného enzymu (zúčastněných enzymů) (např. enzymy fáze I, jako jsou isoenzymy systému monooxygenázy závislém na cytochromu P450, enzymy fáze II, jako jsou isoenzymy sulfotransferázy nebo uridin-difosfát-glukuronosyl-transferázy nebo jakékoli další relevantní enzymy). Tyto informace lze použít ke zhodnocení vhodnosti mezidruhových extrapolací.

57. Ke zhodnocení změn TK souvisejících se zkoušenou chemickou látkou by se měly použít vhodné protokoly studie, náležitě validované a zdůvodněné. Ukázkové plány studie se skládají z opakovaného podávání dávky neznačené zkoušené chemické látky, po němž následuje 14. den jednorázová radioizotopově značená dávka nebo opakované podávání dávek radioizotopově značené zkoušené chemické látky a odběry vzorků 1., 7. a 14. den ke stanovení profilu metabolitů. Opakované podávání dávky radioizotopově značené zkoušené chemické látky může rovněž poskytnout informace o bioakumulaci (viz odstavec 26).

DOPLŇKOVÉ POSTUPY

58. Doplňkové postupy nad rámec experimentů *in vivo* popsané v této zkušební metodě mohou poskytnout užitečné informace o absorpci, distribuci, metabolismu či eliminaci zkoušené chemické látky u určitých druhů.

Použití informací *in vitro*

59. Několik otázek týkajících se metabolismu zkoušené chemické látky lze vyřešit pomocí studií *in vitro* používajících vhodné zkušební systémy. Čerstvě izolované nebo kultivované hepatocyty a subcelulární frakce (např. mikrozomy a cytosol nebo frakce S9) z jater lze použít ke studiu možných metabolitů. Lokální metabolismus v cílovém orgánu, např. plicích, může být předmětem zájmu při posuzování rizik. K těmto účelům mohou být vhodné mikrozomální frakce cílových tkání. Studie na mikrozomech mohou být užitečné ke zkoumání potenciálních rozdílů mezi pohlavími a životními stadii a k charakterizaci enzymatických parametrů (K_m a V_{max}), které mohou pomoci při hodnocení závislosti metabolismu na dávce v souvislosti s úrovněmi expozice. Dále mohou být mikrozomy užitečné k identifikaci specifických mikrozomálních enzymů účastnících se metabolismu zkoušené chemické látky, které mohou být významné při mezidruhové extrapolaci (viz také odstavec 56). Schopnost indukce biotransformace lze rovněž zkoumat za použití subcelulárních frakcí z jater (např. mikrozomy a cytosol) zvířat předběžně vystavených příslušné zkoušené chemické látce, *in vitro* prostřednictvím studií indukce hepatocytů nebo pomocí specifických buněčných linií exprimujících příslušné enzymy. Za určitých okolností a vhodných podmínek lze uvažovat o použití subcelulárních frakcí z lidských tkání k stanovení potenciálních rozdílů v biotransformaci mezi druhy. Výsledky zkoumání *in vitro* mohou být rovněž užitečné při vývoji modelů PBTK (5).

▼M4

60. *In vitro* studie dermální absorpce mohou poskytnout doplňující informace k charakterizaci absorpce (6).

61. Primární buněčné kultury z jaterních buněk a čerstvé tkáňové řezy lze použít k zodpovězení podobných otázek jako u jaterních mikrozomů. V určitých případech se může podařit zodpovědět konkrétní otázky za použití buněčných linií s definovanou expresí příslušného enzymu nebo buněčných linií připravených pomocí genetického inženýrství. V určitých případech může být užitečné studovat inhibici a indukci specifických isoenzymů cytochromu P450 (např. CYP1A1, 2E1, 1A2 a dalších) a/nebo enzymů fáze II mateřskou sloučeninou ve studiích *in vitro*. Získané informace mohou být užitečné u sloučenin s podobnou strukturou.

Použití toxikokinetických údajů ze studií toxicity jako doplňující informace

62. Analýza vzorků krve, tkání a/nebo exkretů získaných během jakýchkoli jiných studií toxicity může poskytnout údaje o biologické dostupnosti, změnách v plazmatických koncentracích v čase (AUC, C_{max}), schopnosti bioakumulace, rychlostech clearance a o změnách v metabolismu a kinetice souvisejících s pohlavím nebo životním stadiem.

63. Posouzení plánu studie lze použít k zodpovězení otázek týkajících se saturace absorpce, drah biotransformace nebo exkrece při vyšších úrovních dávek, působení nových metabolických drah při vyšších úrovních dávek a omezení toxických metabolitů na vyšší dávky.

64. Další úvahy při hodnocení nebezpečnosti by se mohly týkat například těchto charakteristik:

— citlivosti spojené s věkem v důsledku rozdílů ve stavu hematoencefalické bariéry, ledvin a/nebo detoxikačních schopností,

— subpopulační citlivosti v důsledku rozdílů v biotransformačních schopnostech nebo jiných TK rozdílech,

— míry expozice plodu prostřednictvím transplacentárního přenosu chemických látek nebo novorozence prostřednictvím laktace.

Použití toxikokinetického modelování

65. Toxikokinetické modely mohou být užitečné pro různé aspekty posouzení nebezpečnosti a rizik, například při predikci systémové expozice a vnitřní dávky v tkáni. Dále je možno zabývat se v těchto modelech specifickými otázkami týkajícími se způsobu účinku a tyto modely mohou představovat základ pro mezidruhovou extrapolaci, extrapolaci mezi cestami expozice, režimy dávkování a pro posouzení rizik pro člověka. Mezi údaje, které jsou užitečné pro vývoj modelů PBTK pro zkoušenou chemickou látku u jakéhokoliv druhu, patří 1) rozdělovací koeficienty, 2) biochemické konstanty a fyziologické parametry, 3) absorpční parametry specifické pro cestu podání a 4) *in vivo* kinetické údaje pro modelové hodnocení [např. parametry clearance pro příslušné (> 10 %) dráhy exkrece, K_m a V_{max} pro metabolismus]. Experimentální data používaná při vývoji modelu by měla být získána pomocí řádných vědeckých metod a modelové výsledky by měly být validovány. K usnadnění vývoje nekompartmentálních modelů nebo modelů na fyziologické bázi se často stanovují parametry specifické pro zkoušenou chemickou látku a živočišný druh, jako jsou rychlosti absorpce, rozdělení látky mezi krev a tkáně a konstanty metabolické rychlosti.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

66. Doporučuje se, aby ve zprávě o studii byl uveden i její obsah.

Hlavní část zprávy

67. Hlavní část zprávy by měla obsahovat informace získané v této zkušební metodě rozčleněné do oddílů a odstavců následujícím způsobem:

Shrnutí

68. Tento oddíl zprávy o studii by měl obsahovat shrnutí plánu studie a popis použitých metod. Měl by také zdůraznit klíčové výsledky týkající se látkové bilance, povahy a významu metabolitů, tkáňových reziduí, rychlosti clearance, bioakumulačního potenciálu, rozdílů mezi pohlavími atd. Souhrn by měl být dostatečně podrobný, aby umožňoval zhodnocení výsledků.

Úvod

69. Tento oddíl zprávy by měl obsahovat cíle studie, zdůvodnění a plán a rovněž příslušné odkazy na literaturu a jakékoli podkladové historické údaje.

Materiál a metody

70. Tento oddíl zprávy by měl obsahovat podrobné popisy všech relevantních informací, mezi něž patří:

a) Zkoušená chemická látka

Tento pododdíl by měl obsahovat identifikaci zkoušené chemické látky: chemický název, molekulární strukturu, kvalitativní a kvantitativní stanovení jejího chemického složení, chemickou čistotu a – je-li to možné – druh a množství nečistot. Rovněž by měl obsahovat informace o fyzikálně-chemických vlastnostech včetně skupenství, barvy, přibližné rozpustnosti a/nebo rozdělovacího koeficientu, stability a případně žíravosti. Případně by se měly uvést informace o izomerech. Je-li zkoušená chemická látka radioizotopově značená, měly by se do tohoto pododdílu zahrnout informace o typu radionuklidu, pozici značky, specifické aktivitě a radiochemické čistotě.

Měl by se uvést druh nebo popis jakéhokoliv nosiče, rozpouštědel, suspenzních a emulgačních činidel či jiných materiálů použitých při podávání zkoušené chemické látky.

b) Pokusná zvířata

Tento pododdíl by měl obsahovat informace o pokusných zvířatech, včetně výběru druhu a zdůvodnění výběru příslušného druhu, kmene a stáří na počátku studie, pohlaví a rovněž tělesné hmotnosti, zdravotního stavu a zvířecího chovu.

c) Metody

Tento pododdíl by měl obsahovat podrobnosti o plánu studie a použité metodice. Měl by zahrnovat:

1) zdůvodnění jakékoli úpravy cesty expozice a případně podmínek expozice;

▼M4

2) zdůvodnění výběru úrovní dávek;

3) popis pilotních studií použitých v experimentálním plánu následných studií, je-li to vhodné. Měly by se předložit podpůrné údaje pro pilotní studie;

4) popis přípravy podávaného roztoku a druh použitého rozpouštědla nebo nosiče, pokud se používaly;

5) počet exponovaných skupin zvířat a počet zvířat v každé skupině;

6) úrovně a objemy dávek (a specifická aktivita dávky, používá-li se radioaktivita);

7) cestu (cesty) a způsoby podání;

8) četnost podávání dávky;

9) období lačnění (pokud se použilo);

10) celkovou radioaktivitu působící na každé zvíře;

11) popis manipulace se zvířaty;

12) odběr vzorků a manipulace s nimi;

13) analytické metody použité k separaci, kvantifikaci a identifikaci metabolitů;

14) mez detekce použitých metod;

15) další použitá experimentální měření a postupy (včetně validace metod pro analýzu metabolitů).

d) Statistická analýza

Pokud se k analýze výsledků studie používá statistická analýza, měly by se uvést dostatečné informace o metodě analýzy a použitý výpočetní program, aby mohl nezávislý recenzent/statistik analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat.

V případě studií modelujících systémy, například PBTK, by mělo představení modelů obsahovat kompletní popis modelů umožňující nezávislou rekonstrukci a validaci modelu (viz odstavec 65 a dodatek: Definice).

Výsledky

71. Veškeré údaje by se měly shrnout a uvést v tabulkách spolu s příslušným statistickým vyhodnocením a popsat v textu tohoto oddílu. Naměřené údaje o radioaktivitě by se měly shrnout a uvést způsobem vhodným pro studii, obvykle jako počet mikrogramů nebo miligramů na hmotnost vzorku, lze však použít i jiné jednotky. Tento oddíl by měl obsahovat grafická znázornění výsledků, reprodukci příslušných chromatografických a spektrometrických údajů, identifikaci/kvantifikaci metabolitů a navrhované metabolické dráhy, včetně molekulární struktury metabolitů. Kromě toho by se měly v tomto oddíle uvést následující informace, je-li to možné:

1) kvantita a procentuální výtěžek radioaktivity v moči, výkalech, vydechovaném vzduchu a v rozpouštědle po vymytí klece od moči a výkalů:

— u dermálních studií rovněž uveďte údaje o výtěžku zkoušené chemické látky z exponované kůže, oplachů kůže a zbytkovou radioaktivitu v materiálu pokrývajícím kůži a v metabolické jednotce a také výsledky studie oplachů kůže. Další diskusi naleznete v odstavcích 74–77,

▼M4

— u inhalačních studií rovněž uveďte údaje o výtěžku zkoušené chemické látky z plic a nosních tkání (8). Další diskusi naleznete v odstavci 78;

2) distribuce v tkáních uvedená jako procento podané dávky a koncentrace (počet mikrogramů na gram tkáně) a podíly množství látky v tkáni vůči krvi nebo v tkáni vůči plazmě;

3) látková bilance z každé studie zahrnující rozbor tělních tkání a exkretů;

4) plazmatické koncentrace a toxikokinetické parametry (biologická dostupnost, AUC, Cmax, Tmax, clearance, eliminační poločas) po podání látky příslušnou cestou (příslušnými cestami) expozice;

5) rychlost a míra absorpce zkoušené chemické látky po podání příslušnou cestou (příslušnými cestami) expozice;

6) množství zkoušené chemické látky a metabolitů (uvedená jako procento podané dávky) v exkretech;

7) odkaz na údaje v dodatku, které obsahují všechny údaje týkající se měřených cílových parametrů u jednotlivých zvířat (např. podání dávky, procentuální výtěžek, koncentrace, TK parametry atd.);

8) Obrázek s navrhovanými metabolickými drahami a molekulárními strukturami metabolitů.

Diskuse a závěry

72. V tomto oddíle by měl autor (by měli autoři):

1) uvést navrhovanou metabolickou dráhu vycházející z výsledků týkajících se metabolismu a rozmístění zkoušené chemické látky;

2) prodiskutovat jakékoli potenciální druhové a pohlavní rozdíly týkající se distribuce a/nebo biotransformace zkoušené chemické látky;

3) uvést v tabulkách a prodiskutovat identifikaci a význam metabolitů, rychlosti clearance, bioakumulační potenciál a množství tkáňových reziduí mateřské sloučeniny a/nebo metabolitu (metabolitů) a rovněž změny TK parametrů v závislosti na dávce, je-li to vhodné;

4) zahrnout do tohoto oddílu všechny relevantní TK údaje získané během provádění studií toxicity;

5) uvést stručný a výstižný závěr, který lze podložit výsledky studie;

6) přidat další oddíly (dle potřeby či vhodnosti).

73. Další oddíly by měly sloužit k uvedení podpůrných informací z literatury, tabulek, obrázků, dodatků atd.

▼M4

ALTERNATIVNÍ CESTY EXPOZICE

Dermální

Dermální aplikace

74. Tento oddíl uvádí specifické informace ohledně zkoumání toxikokinetiky zkoušené chemické látky při aplikaci dermální cestou. Pro informace o dermální absorpci je třeba nahlédnout do kapitoly B.44 této přílohy [Absorpce kůží: metoda *in vivo* (9)]. U ostatních cílových parametrů, jako jsou distribuce a metabolismus, je možno použít tuto zkušební metodu B.36. Při dermální aplikaci by se měla použít jedna nebo více úrovní dávky zkoušené chemické látky. Zkoušená chemická látka (např. čistý, zředěný, nebo formulovaný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku, která je aplikována na kůži) by měla být stejná jako ta, které mohou být lidé nebo jiné potenciální cílové druhy vystaveny (nebo by měla být její realistickou náhražkou). Úroveň (úrovně) dávky by se měly vybrat v souladu s odstavci 20–26 této zkušební metody. Mezi faktory, které by se měly vzít v úvahu při výběru dermální dávky, patří očekávaná expozice člověka a/nebo dávky, při nichž byla pozorována toxicita v jiných studiích dermální toxicity. Dermální dávka (dávky) by se měla v případě potřeby rozpustit ve vhodném nosiči a aplikovat v objemu dostatečném pro její dodání. Krátce před zahájením zkoušky by se měla zvířatům ostříhat srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její prostupnost. Pro aplikaci zkoušené chemické látky by se mělo obnažit přibližně 10 % tělesného povrchu. U vysoce toxických chemických látek může být tato plocha menší než přibližně 10 %, avšak měla by se pokrýt co možná největší plocha tenkou a rovnoměrnou vrstvičkou látky. U všech zkoušených skupin by se měla k aplikaci látky použít stejná plocha povrchu. Plochy s nanesenou dávkou by se měly chránit vhodným krytím, které se upevní v daném místě. Zvířata by se měla chovat odděleně.

75. Měla by se provést studie mytí kůže k stanovení množství aplikované dávky zkoušené chemické látky, které lze z kůže odstranit mytím ošetřené oblasti kůže jemným mýdlem a vodou. Tato studie může rovněž pomoci při stanovování látkové bilance, pokud je zkoušená chemická látka podávána dermální cestou. Při této studii mytí kůže by se měla aplikovat dvěma zvířatům jedna dávka zkoušené chemické látky. Úroveň dávky se zvolí v souladu s odstavcem 23 této zkušební metody (viz rovněž diskusi o době kontaktu s kůží v odstavci 76). Měla by se stanovit množství zkoušené chemické látky získaná z těchto mytí, aby se zhodnotila účinnost odstranění zkoušené chemické látky mytím.

76. Pokud to není vyloučeno kvůli žíravosti, měla by se zkoušená chemická látka aplikovat a udržovat na kůži alespoň 6 hodin. Po odstranění krytí by se měla ošetřená oblast umýt postupem uvedeným ve studii mytí kůže (viz odstavec 75). V krytí i v tekutině z mytí by se měla analyzovat zbytková zkoušená chemická látka. Při ukončení studií by se měla všechna zvířata humánním způsobem utratit v souladu s (2) a ošetřená kůže se odstraní. Měla by se analyzovat příslušná část ošetřené kůže, aby se stanovila zbytková zkoušená chemická látka (radioaktivita).

77. Pro toxikokinetické hodnocení farmaceutik mohou být zapotřebí různé postupy, v souladu s příslušným regulačním systémem.

▼M4

Inhalační

78. Měla by se použít jedna koncentrace (či více, je-li to třeba) zkoušené chemické látky. Koncentrace by se měla (měly) vybrat v souladu s odstavci 20–26 této zkušební metody. Inhalační expozice by se měly provést pomocí „nosního konusu“ nebo přístroje typu „pouze hlava“, aby se zabránilo absorpci alternativními cestami expozice (8). Používají-li se jiné podmínky inhalační expozice, mělo by být zdokumentováno zdůvodnění této změny. Měla by se definovat délka inhalační expozice, obvykle expozice trvá 4–6 hodin.

LITERATURA:

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

6) Kapitola B.45 této přílohy, Absorpce kůží: Metoda in vitro.

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.44 této přílohy, Absorpce kůží: Metoda in vivo.

10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatek

DEFINICE

Absorpce: Proces(y) příjmu či prostupování chemických látek tkáněmi. Absorpce se týká mateřské sloučeniny a všech jejích metabolitů. Nezaměňovat s „biologickou dostupností“.

Akumulace (bioakumulace): Zvýšení množství zkoušené chemické látky v tkáních (obvykle v tukových tkáních po opakované expozici) postupem času. Pokud je přísun zkoušené chemické látky do těla větší než rychlost, kterou je vylučována, organismus zkoušenou chemickou látku akumuluje a je možno dosáhnout toxických koncentrací zkoušené chemické látky.

ADME: Akronym pro „absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece“.

AUC: (Plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase): Plocha pod křivkou v grafu vyjadřujícím závislost koncentrace zkoušené chemické látky v plazmě na čase. Představuje celkové množství zkoušené chemické látky absorbované tělem za předem stanovené časové období. Za lineárních podmínek je AUC (od času nula až do nekonečna) úměrná celkovému množství zkoušené chemické látky absorbované tělem bez ohledu na rychlost absorpce.

Autoradiografie: (Celotělová autoradiografie): Používá se ke kvalitativnímu a/nebo kvantitativnímu určení lokalizace radioaktivní zkoušené chemické látky v tkáni. Tato technika používá radiografický film nebo v poslední době skenování využívající fosforové záznamové desky k vizualizaci radioaktivně značených molekul nebo fragmentů molekul prostřednictvím záznamu záření vydávaného studovaným objektem. Kvantitativní celotělová autoradiografie může mít v porovnání s pitvou orgánů různé výhody při hodnocení distribuce zkoušené chemické látky a stanovení celkové výtěžnosti a rozlišení radioaktivního materiálu v tkáních. Jednou, velmi podstatnou výhodou je například to, že ji lze používat u pigmentovaného zvířecího modelu k stanovení možné vazby zkoušené chemické látky na melanin, který je schopen vázat určité molekuly. Přestože tato technika může poskytovat vhodné celotělové přehledy vazebných míst o vysoké kapacitě a nízké afinitě, při rozeznávání specifických cílových míst, jako jsou receptorová vazebná místa, kde je k detekci zapotřebí poměrně vysoké rozlišení a vysoká citlivost, může mít naopak svá omezení. Používá-li se autoradiografie, měly by se experimenty určené ke stanovení látkové bilance podané sloučeniny provádět jako samostatná skupina nebo v rámci samostatné studie oddělené od experimentu stanovujícím tkáňovou distribuci, v němž se všechny exkrety (které mohou zahrnovat rovněž vydechovaný vzduch) a celá mrtvá těla homogenizují a analyzují pomocí kapalinové scintilační spektrometrie.

Biliární exkrece: Exkrece žlučovody.

Bioakumulace: Viz „akumulace“.

Biologická dostupnost (biodostupnost): Frakce podané dávky, která se dostane do systémového oběhu nebo je k dispozici v místě fyziologického působení. Biologická dostupnost zkoušené chemické látky se obvykle týká mateřské sloučeniny, ale mohla by se vztahovat i na její metabolit. Bere v úvahu pouze jednu chemickou formu. *Poznámka:* biologická dostupnost a absorpce nejsou totéž. Rozdíl mezi např. orální absorpcí (tj. přítomností látky ve střevní stěně a portálním oběhu) a biologickou dostupností (tj. přítomností látky v systémovém oběhu a tkáních) může vzniknout mimo jiné v důsledku rozkladu látky v rámci metabolismu střevní stěny nebo transportu prostřednictvím efluxních pump zpět do dutiny střeva nebo presystémového metabolismu v játrech (10). Biologická dostupnost toxické složky (mateřské sloučeniny nebo metabolitu) je rozhodujícím parametrem při posuzování rizika pro člověka (extrapolace z vysokých dávek do oblasti nízkých dávek, extrapolace mezi cestami) k odvození vnitřní hodnoty z externích hodnot NOAEL či BMD (aplikovaná dávka). Pro účinky na játra po orálním podání je dostačující znát orální absorpci. Nicméně pro všechny ostatní účinky, kromě účinků v místě vstupu, je obecně spolehlivějším parametrem pro další použití v posouzení rizika biologická dostupnost, nikoliv absorpce.

▼M4

Bioperzistence: Viz „perzistence“.

Biotransformace: (Obvykle enzymová) chemická konverze zkoušené chemické látky v těle na odlišnou chemickou látku. Synonymní s pojmem „metabolismus“.

C_{max}: Buď maximální (vrcholová) koncentrace v krvi (plazmě/séru) po podání nebo maximální (vrcholová) exkrece (v moči nebo výkalech) po podání.

Rychlost clearance: Kvantitativní míra rychlosti, jakou je zkoušená chemická látka odstraňována z krve, plazmy nebo určité tkáně za jednotku času.

Kompartment: Strukturní nebo biochemická část (či jednotka) těla, tkáně nebo buňky, která je oddělena od zbytku.

Detoxikační dráhy: Série kroků vedoucích k eliminaci toxických chemických látek z těla buď metabolickou přeměnou, nebo exkrecí.

Distribuce: Rozšíření zkoušené chemické látky a jejích derivátů v celém organismu.

Enzymy/isoenzymy: Proteiny, které katalyzují chemické reakce. Isoenzymy jsou enzymy, které katalyzují podobné chemické reakce, avšak liší se ve svých aminokyselinových sekvencích.

Enzymové parametry: K_m: Michaelisova konstanta a V_{max}: maximální rychlost

Exkrece: Proces(y), kterým(i) se podaná zkoušená chemická látka a/nebo její metabolity odstraňují z těla.

Exogenně: Zavedený z vnějšku nebo produkovaný mimo organismus nebo systém.

Extrapolace: Odvození jedné nebo více neznámých hodnot na základě známých nebo pozorovaných skutečností.

Eliminační poločas ($t_{1/2}$): Doba nutná k poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v kompartmentu o jednu polovinu. Obvykle se vztahuje k plazmatické koncentraci nebo množství zkoušené chemické látky v celém těle.

Indukce / enzymová indukce: Enzymová syntéza v reakci na environmentální stimul nebo molekulu induktoru.

Linearita / lineární kinetika: Proces je ve smyslu kinetiky lineární, pokud všechny rychlosti přenosu mezi kompartmenty jsou úměrné přítomným množstvím nebo koncentracím, tj. prvního řádu. V důsledku toho jsou clearance, distribuční objemy a rovněž eliminační poločasy konstantní. Dosažené koncentrace jsou úměrné míře dávkování (expozice) a akumulaci lze snadněji předpovídat. Linearitu/nelinearitu lze vyhodnotit porovnáním příslušných parametrů, např. AUC, po různých dávkách nebo po jednorázové a opakovaných expozicích. Nepřítomnost závislosti na dávce může nasvědčovat saturaci enzymů účastnících se metabolismu dané sloučeniny, vzestup AUC po opakované expozici v porovnání s jednorázovou expozicí může naznačovat inhibici metabolismu a pokles AUC může svědčit o indukci metabolismu [viz také (11)].

Látková bilance: Bilance zkoušené chemické látky vstupující do systému a opouštějící systém.

Hmotnostní bilance: Viz „látková bilance“.

Mechanismus (způsob) toxicity / mechanismus (způsob) účinku: Mechanismus účinku se vztahuje k specifickým biochemickým interakcím, pomocí nichž zkoušená chemická látka účinkuje. Způsob účinku se vztahuje k obecnějším drahám vedoucím k toxicitě zkoušené chemické látky.

▼M4

Metabolismus: Synonymní s pojmem „biotransformace“.

Metabolity: Produkty metabolismu nebo metabolických procesů.

Orální absorpce: Procento dávky zkoušené chemické látky absorbované z místa podání (tj. GI traktu). Tento kritický parametr lze použít k pochopení frakce podané chemické látky, která se dostane až do vrátnicové žíly a následně do jater.

Rozdělovací koeficient: Rovněž znám jako distribuční koeficient, je měřítkem diferenciální rozpustnosti chemické látky ve dvou rozpouštědlech.

Maximální hladiny v krvi (plazmě/séru): Maximální (vrcholová) koncentrace v krvi (plazmě/séru) po podání (viz také „C_{max}“).

Perzistence (bioperzistence): Dlouhodobá přítomnost chemické látky (v biologickém systému) v důsledku odolnosti vůči degradaci/eliminaci.

Analogický přístup: Informace o cílovém parametru u jedné nebo více chemických látek se použijí k odhadu cílového parametru u cílové chemické látky.

Receptorová mikroskopická autoradiografie (nebo receptorová mikroautoradiografie): Tuto techniku lze použít k vyšetření xenobiotických interakcí se specifickými místy v tkáních nebo buněčných populacích, například ve studiích vazeb na receptory či specifických způsobů účinku, které mohou vyžadovat vysoké rozlišení a vysokou citlivost, jež nemusí být dosažitelná s pomocí jiných technik, jako je celotělová autoradiografie.

Cesta podání (orální, nitrožilní, dermální, inhalační atd.): Vztahuje se ke způsobu, jakým jsou chemické látky dopraveny do těla (např. orálně sodnou, orálně v krmivu, dermálně, inhalací, nitrožilně atd.).

Saturace: Stav, kdy jeden nebo více kinetických (např. absorpce, metabolismus či clearance) proces(ů) dosáhne maxima (tzn. „je saturován“).

Citlivost: Schopnost metody nebo přístroje rozlišit mezi naměřenými odezvami představujícími různé hodnoty dotčené proměnné.

Ustálené hladiny v krvi (plazmě): Nerovnovážný stav otevřeného systému, kdy všechny síly působící na systém jsou přesně vyrovnávány opačnými silami, a to takovým způsobem, že všechny složky systému mají neměnnou koncentraci, přestože systémem proudí hmota.

Modelování systémů (toxikokinetické založené na fyziologii, založené na farmakokinetice, farmakokinetické založené na fyziologii, založené na biologii atd.): Abstraktní model, který používá k popisu chování systému matematický jazyk.

Cílová tkáň: Tkáň, v níž se projevuje hlavní nepříznivý účinek toxické látky.

▼M4

Zkoušená chemická látka: Jakákoli chemická látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Distribuce v tkáních: Reverzibilní pohyb zkoušené chemické látky z jednoho místa v těle do jiného. Distribuci v tkáních lze studovat pomocí pitvy orgánů, homogenizace, spálení a kapalinové scintilační spektrometrie či pomocí kvalitativní a/nebo kvantitativní celotělové autoradiografie. První způsob je užitečný pro získání hodnoty koncentrace a procentuální výtěžnosti z tkání a zbylého mrtvého těla stejných zvířat, avšak nemusí mít dostatečné rozlišení pro všechny tkáně a může mít menší než ideální celkovou výtěžnost (< 90 %). Definici druhého způsobu viz výše.

T_{max}: Doba potřebná k dosažení C_{max}.

Toxikokinetika (Farmakokinetika): Studie absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování chemických látek v průběhu času.

Validace modelů: Postup zhodnocení adekvátnosti modelu pro účely konzistentního popisu dostupných toxikokinetických údajů. Modely lze vyhodnotit pomocí statistického a vizuálního porovnání modelových předpovědí s experimentálními hodnotami oproti společné nezávislé proměnné (např. čas). Rozsah hodnocení by se měl odůvodnit vzhledem k určenému použití modelu.

▼B

B.37 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI

1. METODA

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studiemi toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látka může být zkoušena v pozitivní kontrolní skupině s cílem prokázat, že se v laboratorních podmínkách reakce pokusných druhů podstatně nezměnila.

Příkladem široce používané látky s pozdním toxickým účinkem je tri-o-tolyl-fosfát (CAS 78308, EINECS 2011035, název podle CAS: tris(2methylfenyl)fosfát), známá také pod názvem triokresylfosfát (TOCP).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává orálně v jediné dávce slepicím domácím, chráněným před možnými akutními cholinergními účinky. Zvířata se pozorují po dobu 21 dnů, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a peréza. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dvacet jedna dnů po podání látky se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Příprava**

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chůzi, přiřadí se do experimentální a kontrolní skupiny a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Zkoušená látka se obvykle podává orálně sondou, želatinovými tobolkami nebo srovnatelnou metodou. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, jako je např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.5.2 **Zkušební podmínky**

1.5.2.1 *Pokusná zvířata*

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

1.5.2.2 *Počet a pohlaví*

Kromě experimentální skupiny by měla být použita kontrolní skupina s vehikulem a pozitivní kontrolní skupina. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 21denní pozorování patologických příznaků.

Pozitivní kontrolní skupina může být zkoušena souběžně nebo mohou být použity údaje z nedávno použité kontrolní skupiny. Měla by zahrnovat nejméně šest slepic, kterým se podá látka, o níž je známo, že vyvolává pozdní neurotoxicitu, tři slepice pro biochemické vyšetření a tři slepice pro histopatologické vyšetření. Doporučuje se periodicky doplňovat historické údaje. Nové pozitivní kontrolní údaje by měly být doplněny, pokud provádějící laboratoř v průběhu testu změní některý základní prvek zkoušky (např. plemeno, stravu, podmínky chovu).

▼B

1.5.2.3 *Úrovně dávek*

Měla by se provést předběžná studie za použití vhodného počtu slepic a skupin s různými úrovněmi dávek, aby bylo možné stanovit úroveň, která má být použita v hlavní studii. Pro stanovení přiměřené dávky v hlavní studii je v této předběžné studii nezbytná určitá letalita. Aby se však zabránilo úhynu vlivem akutních cholinergních účinků, lze použít atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické reakce. Pro odhad nejvyšší neletální dávky zkoušených látek lze použít řadu metod (viz metoda B.1a). Při výběru dávky mohou být užitečné také dosavadní údaje o slepicích nebo jiné toxikologické informace.

Úroveň dávky zkoušené látky v hlavní studii by měla být co nejvyšší, přičemž se berou v úvahu výsledky předběžné studie výběru dávky a horní limit dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Případný úhyn by neměl narušit dostatečný počet zvířat pro biochemická vyšetření (šest) a pro histologická vyšetření (šest) po 21 dnech. Aby se zabránilo úmrtí vlivem akutních cholinergních účinků, použije se atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické účinky.

1.5.2.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.3 **Doba pozorování**

Doba pozorování by měla být 21 dnů.

1.5.4 Postup

Po podání přípravku chránícího před uhynutím na následky akutního cholinergního účinku se podá zkoušená látka v jedné dávce.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě několikrát denně pozorují v průběhu prvních dvou dnů a poté nejméně jednou denně po dobu 21 dnů nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání abnormálního chování. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice určené s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupání po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

▼B

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny (pokud se zkouška souběžně provádí s touto skupinou) se usmrtí v prvních dnech po podání látky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být rovněž vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách, zatímco tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí po 24 hodinách. Pokud pozorování klinických příznaků toxicity naznačuje, že se toxická látka v organismu vstřebává velmi pomalu (to lze často posoudit pozorováním doby nástupu cholinergních příznaků), může být vhodnější odebrat vzorek tkáně dvakrát ze tří zvířat mezi 24 až 72 hodinami po podání látky.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. *In vivo* však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

Pitva

Pitva všech zvířat (usmrcených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ,* za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řezy míchy by měly být odebrány z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části n. tibialis a jeho větví k m. gastrocnemius a z n. ischiadicus. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony.

2. **ÚDAJE**

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojznačných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

▼B

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

3.1 Pokusná zvířata:

— použité plemeno,

— počet a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

3.2 Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,

— zdůvodnění volby vehikula,

— podrobné údaje o podání zkoušené látky,

— podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,

— identifikace jakéhokoli ochranného přípravku a podrobné informace o jeho podání.

3.3 Výsledky:

— údaje o tělesné hmotnosti,

— údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 418.

▼B

B.38 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE

1. METODA

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studiemi toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

28denní zkouška pozdní neurotoxicity poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit z opakovaných expozic během omezeného časového období. Poskytne informace o reakci na dávku a může poskytnout odhad úrovně bez pozorovatelných nepříznivých účinků, což může být užitečné při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušené látky se podávají denně orálně slepicím domácím po dobu 28 dnů. Zvířata se pozorují nejméně jednou denně, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a paréza ještě 14 dnů po poslední dávce. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dva týdny po poslední dávce se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava**

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chůzi, přiřadí se do experimentální a kontrolních skupin a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Zkoušená látka se podává každý den, 7 dnů v týdnu, nejlépe orálně sondou nebo želatinovými tobolkami. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

Pokusná zvířata

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

Počet a pohlaví

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální skupiny a kontrolní skupina s vehikulem. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou s vehikulem zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 14denní pozorování patologických příznaků.

Úrovně dávek

Při výběru úrovní dávek by měly být vzaty v úvahu tři výsledky akutní zkoušky pozdní neurotoxicity a jakékoli další dostupné údaje o toxicitě a kinetice zkoušené sloučeniny. Nejvyšší úroveň dávky by měla být vybrána s cílem vyvolat toxické účinky, nejlépe pozdní neurotoxicitu, ne však uhynutí nebo zjevné utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje závislost účinku na dávce a že nejnižší dávka nevyvolává žádné projevy toxicity.

▼B

Limitní zkouška

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Doba pozorování

Všechna zvířata by měla být pozorována nejméně jednou denně po dobu expozice a 14 dnů po ní až do provedení pitvy podle plánu.

1.4.3 **Postup**

Zvířatům se podává zkoušená látka sedm dnů v týdnu po dobu 28 dnů.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě pozorují jednou denně každý den z 28 dnů expozice a 14 dnů po expozici nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání. Pozorování má zahrnovat abnormality chování, ale nemá se na ně omezovat. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupání po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí v prvních dnech po podání poslední dávky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách od poslední dávky. Pokud údaje z akutní studie nebo z jiných studií (např. toxikokinetických) naznačují, že jsou vhodné jiné doby usmrcení po poslední dávce než tyto doby, měly by být použity a zdůvodnění by mělo být uvedeno v dokumentaci.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. In vivo však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

▼B

Pitva

Pitva všech zvířat (usmrcených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ,* za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řez míchy by měl být proveden z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části *n. tibialis* a jeho větví k *m. gastrocnemius* a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony. Nejprve by mělo být provedeno mikroskopické vyšetření fixované tkáně všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se u skupiny s vysokou dávkou projeví účinky, mělo by být mikroskopické vyšetření provedeno také na slepicích ze skupiny se střední a nízkou dávkou.

2. **ÚDAJE**

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojznačných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce obsahuje pokud možno tyto informace:

3.1 Pokusná zvířata:

— použité plemeno,

— počet a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

▼B

3.2 Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,

— zdůvodnění volby vehikula,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,

— podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,

— zdůvodnění jiných časů odběru pro biochemické vyšetření, není-li použito 24 a 48 hodin.

3.3 Výsledky:

— údaje o tělesné hmotnosti,

— údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,

— úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— popřípadě statistické zpracování výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 419.

▼B

B.39 ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 486. Zkouška na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem zkoušky na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* je identifikovat zkoušené látky, které indukují reparace DNA v jaterních buňkách exponovaných zvířat (1, 2, 3, 4).

Tato zkouška *in vivo* poskytuje metodu vyšetření genotoxických účinků chemických látek v játrech. Stanovovaný jev je ukazatelem poškození DNA a následné reparace v jaterních buňkách. Játra jsou obvykle hlavním místem, kde jsou absorbované sloučeniny metabolizovány. Jsou tedy vhodným místem pro hodnocení míry poškození DNA *in vivo*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nedostane do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Rozsah neplánované syntézy DNA (UDS) se zhodnotí stanovením inkorporace značených nukleosidů do buněk, které neprošly plánovanou syntézou DNA (S-fází). Nejrozšířenější technikou je autoradiografické stanovení inkorporace thymidinu značeného tritiem (^{3}H-TdR). Pro zkoušky na UDS *in vivo* se přednostně používají játra potkana. Jiné tkáně než játra mohou být rovněž použity, nejsou však předmětem této metody.

Detekce odpovědi UDS závisí na počtu bází DNA vyštěpených a nahrazených v místě poškození. Zkouška na UDS je tedy vhodná zvláště pro detekci dlouhých reparací („long-patch repair“) (20 až 30 bází) indukovaných látkou. Krátké opravy („short-patch repair“) (jedna až tři báze) jsou naproti tomu detekovány s daleko menší citlivostí. Navíc může důsledkem neuskutečněné reparace, chybné reparace nebo chybné replikace lézí DNA dojít k mutagenním událostem. Rozsah odpovědi UDS neposkytuje žádnou informaci o věrnosti reparačních procesů. Navíc je možné, že mutagen reaguje s DNA, ale poškození DNA není opraveno vyštěpovací reparací. Nedostatek specifických informací, které tato zkouška poskytuje o mutagenní aktivitě, je vyvážen potenciální citlivostí tohoto jevu, neboť je vyšetřován v celém genomu.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Opravované buňky: čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG) vyšší než předvolená hodnota stanovená laboratoří provádějící zkoušku.

Čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG): kvantitativní míra UDS aktivity buněk v autoradiografické zkoušce na UDS, vypočtená odečtením průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům od počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG): NNG = NG – CG. Hodnota NNG se vypočte pro jednotlivé buňky, poté společně pro buňky v kultuře, v paralelních kulturách atd.

▼B

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): syntéza reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* indikuje syntézu reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli. Zkouška je obvykle založena na inkorporaci ^{3}H-TdR do DNA jaterních buněk, kde je malá četnost buněk v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ^{3}H-TdR je obvykle stanoveno autoradiografií, jelikož tato technika není tak citlivá na vliv S-fáze buněk jako např. kapalná scintilační spektrometrie.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířete*

Běžně je používán potkan, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný druh savce. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých pohlavně dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti pro obě pohlaví.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

1.4.1.4 *Příprava zkoušené látky*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

▼B

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každé nezávisle prováděné části experimentu by měly být souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. s výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit stejný proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivními kontrolami by měly být látky, o nichž je známo, že jejich podávání v očekávaných expozičních koncentracích vede k nárůstu UDS detekovatelnému nad pozadím. Pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci by měly být použity v dávkách vyvolávající mírnou odpověď (4). Dávky mohou být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo

kódovaná identifikace preparátu. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Doby odběru	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Časné doby odběru (2 až 4 hodiny)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Pozdní doby odběru (12 až 16 hodin)	N-(fluoren-2-yl)acetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Mohou být použity také jiné látky pro pozitivní kontrolu. Je přípustné, aby byla pozitivní kontrolní látka podávána jiným způsobem, než zkoušená látka.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Měl by být použit dostatečný počet zvířat, aby bylo zohledněno přirozené biologické kolísání odpovědi na zkoušku. Každá skupina by se měla skládat alespoň ze tří analyzovatelných zvířat. Jestliže jsou shromážděny dostatečné dosavadní údaje, je pro negativní a pozitivní kontrolní skupiny nezbytné pouze jedno až dvě zvířata.

Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví, nejlépe samců. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky jsou zpravidla podávány jednorázově.

1.5.3 **Dávkování**

Za normálních podmínek se používají alespoň dvě úrovně dávek. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly podle očekávání při stejném režimu dávkování k letalitě. Nižší dávka by měla být zpravidla 50 % až 25 % vyšší dávky.

▼B

Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, jež se použijí v hlavní studii.

Nejvyšší dávka může být definována také jako dávka vyvolávající známky toxicity v játrech (např. pyknotická jádra).

1.5.4 **Limitní zkouška**

Jestliže zkouška s jednou dávkou o alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nemusí být úplná studie nezbytná. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Jiné způsoby podávání jsou možné, lze-li je zdůvodnit. Podávání intraperitoneálně se však nedoporučuje, neboť by játra mohla být exponována zkoušené látce přímo a nikoli prostřednictvím oběhového systému. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

1.5.6 **Příprava jaterních buněk**

Jaterní buňky se připravují z exponovaných zvířat zpravidla 12 až 16 hodin po podání dávky. Doplňující dřívější odebrání vzorků (obecně dvě až čtyři hodiny po expozici) je nezbytné, není-li po 12 až 16 hodinách jasná pozitivní odpověď. Mohou však být použity jiné doby odběru, jsou-li zdůvodněny na základě toxikokinetických údajů.

Krátkodobé kultury jaterních buněk savců se zpravidla zakládají perfuzí jater kolagenasou *in situ* a umožní se, aby se čerstvě disociované jaterní buňky zachytily na vhodném povrchu. Jaterní buňky z negativní kontroly by měly vykazovat životaschopnost (5) alespoň 50 %.

1.5.7 **Stanovení UDS**

Čerstvě izolované jaterní buňky savců se obvykle vhodnou dobu, např. tři až osm hodin, inkubují s médiem obsahujícím ^{3}H-TdR. Na konci inkubační doby by mělo být médium z buněk odstraněno a buňky poté mohou být inkubovány s médiem obsahujícím přebytek neznačeného thymidinu, aby byla snížena neinkorporovaná radioaktivita („cold chase“). Buňky se poté promyjí, fixují a vysuší. Při delší inkubační době nemusí být snížení radioaktivity nezbytné. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulse, exponují se v temnu (např. v chladu 7 až 14 dnů), vyvolají se, obarví a spočítají se exponovaná zrna stříbra. Z každého zvířete se připraví dva až tři preparáty.

▼B

1.5.8 **Analýza**

Preparáty by měly obsahovat dostatečný počet morfologicky normálních buněk, aby mělo hodnocení UDS výpovědní hodnotu. Preparáty se pod mikroskopem prohlédnou na známky zjevné cytotoxicity (např. na pyknosu, sníženou úroveň značení radioaktivním izotopem).

Před počítáním zrn by měly být preparáty kódovány. Zpravidla se vyšetřuje 100 buněk na každé zvíře alespoň ze dvou preparátů; vyšetření méně než 100 buněk/zvíře by mělo být zdůvodněno. Při počítání zrn se jádra v S-fázi nevyšetřují, ale podíl buněk v S-fázi může být zaznamenán.

Množství ^{3}H-TdR inkorporovaného do jader a cytoplasmy morfologicky normálních buněk doložené navrstvením zrn stříbra by mělo být stanoveno vhodnou metodou.

Počet buněk se stanoví z počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG) a z průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům. Jako hodnota CG se použije buď počet buněk pro nejsilněji označenou oblast cytoplasmy, nebo průměrná hodnota dvou až tří náhodně vybraných oblastí v blízkosti dotyčných buněčných jader. Po odpovídajícím zdůvodnění mohou být použity i jiné postupy stanovení počtu buněk (např. počítání celých buněk) (6).

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé preparáty a zvířata. Údaje by měly být dále shrnuty ve formě tabulky. Odečtením hodnoty CG od hodnoty NG by měl být vypočten pro každou buňku, pro každé zvíře a pro každou dávku a čas čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG). Jestliže jsou počítány „opravované“ buňky, měla by být kritéria pro definování „opravovaných“ buněk odůvodněna a založena na dosavadních nebo souběžných údajích o negativních kontrolách. Numerické výsledky mohou být zhodnoceny statistickými metodami. Mají-li být použity, měly by být statistické testy vybrány a odůvodněny před provedením studie.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Mezi příklady kritérií pro pozitivní nebo negativní odpověď patří:

pozitivní
- i) hodnota NNG leží nad prahovou úrovní, která je zdůvodněna na základě dosavadních údajů laboratoře; nebo
- ii) hodnota NNG je významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu;

negativní
- i) hodnota NNG leží na dosavadní prahové hodnotě nebo pod ní; nebo
- ii) hodnota NNG není významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu.

▼B

Měla by být uvažována biologická relevance údajů, tj. měly by být vzaty v úvahu parametry, jako jsou variabilita zvířat, vztah dávky a odpovědi a cytotoxicita. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody. Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v jaterních buňkách savců *in vivo* poškození DNA, které lze opravit neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje poškození DNA, které lze detekovat touto zkouškou.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka dostane do krevního oběhu popř. do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— údaje o přípravě zkoušené látky,

— údaje o podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,

▼B

— případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,

— metody stanovení toxicity,

— metody přípravy a kultivace jaterních buněk,

— použitá autoradiografická technika,

— počet preparátů a počet vyšetřených buněk,

— kritéria hodnocení,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— střední hodnoty počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům a počtu zrn odpovídajících cytoplasmě a čistý počet zrn, jednotlivě pro preparáty, zvířata a skupiny,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické hodnocení,

— známky toxicity,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— počet buněk „opravovaných“ buněk, je-li stanoven,

— počet buněk v S-fázi, je-li stanoven,

— životaschopnost buněk.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, 1–18.

2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, 123–133.

3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52–77.

▼B

4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, 263–285.

5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21–27.

6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553–562.

▼B

B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 430 (2004).

1.1 ÚVOD

Poleptáním kůže se rozumí nevratné poškození tkáně kůže po aplikaci zkoušeného materiálu (definované globálně harmonizovaným systémem klasifikace a označování látek a přípravků (GHS)) (1). Tato metoda uvádí postup posouzení leptavých účinků – žíravosti, který není prováděn na živých zvířatech.

Posuzování leptavých účinků na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (2). Snaha o omezení bolesti a utrpení pokusných zvířat vedla k takové revizi zkušební metody B.4, která umožňuje stanovit leptavé účinky na kůži alternativními metodami *in vitro,* vylučujícími bolest a utrpení zvířat.

Prvním krokem k definování alternativních zkoušek, které by umožňovaly zkoušet leptavé účinky na kůži pro účely regulace, bylo provedení předvalidačních studií (3). Poté byla provedena řádná validační studie metod *in vitro* (6, 7, 8) pro posuzování leptavých účinků na kůži (4, 5). Závěr z těchto studií a z dalších publikací vedl k doporučení, že pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* by mohly být použity tyto zkoušky (9, 10, 11): zkouška pomocí modelu lidské kůže (viz zkušební metodu B.40a) a zkouška transkutánního elektrického odporu (tato metoda).

Validační studie a další publikované studie uvádějí, že stanovení transkutánního elektrického odporu (TER) kůže potkana (12, 13) již umožňuje spolehlivě rozlišovat mezi známými látkami kůži leptajícími (žíravými) a neleptajícími (nežíravými) (5, 9).

Zkouška popsaná v této metodě umožňuje identifikovat leptavé (žíravé) chemické látky a směsi. Dále umožňuje identifikaci neleptavých (nežíravých) látek a směsí, pokud je doložena důkazními stanoveními založenými na dalších dostupných údajích (např. pH, vztahy mezi strukturou a aktivitou, údaje o vlivu na lidi nebo na zvířata) (1, 2, 11, 14). Zkouška neskýtá údaje o dráždivých účincích na kůži ani neumožňuje rozčleňovat žíravé látky na podskupiny, jak to umožňuje globálně harmonizovaný systém klasifikace (GHS) (1).

Úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích se doporučuje provádět strategií postupného zkoušení, jak je uvedeno ve zkušební metodě B.4 (2) a jak je stanoveno globálně harmonizovaným systémem (1). Tato strategie zkoušení zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži *in vitro* (jak je uvedeno v této metodě) a dráždivých účinků na kůži před uvážením zkoušek na živých zvířatech.

▼B

1.2 DEFINICE

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Tabulka 1

Referenční chemické látky

Název	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-1,2-diamin	201-155-9	78-90-0	silně žíravý
kyselina akrylová (kyselina prop-2-enová)	201-177-9	79-10-7	silně žíravá
2-terc -butylfenol	201-807-2	88-18-6	žíravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žíravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žíravá
kyselina oktanová (kyselina kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žíravý
4-amino-1*H*-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	nežíravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežíravý
fenethylbromid	203-130-8	103-63-9	nežíravý
tetrachlorethen	204-825-9	27-18-4	nežíravý
kyselina isostearová	250-178-0	30399-84-9	nežíravá
4-(methylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežíravý

Většina z uvedených látek je převzata ze seznamu látek vybraných pro mezinárodní validační studii ECVAM (4). Jejich výběr je založen na těchto kritériích:

i) stejný počet leptavých (žíravých) a neleptavých (nežíravých) látek,

▼B

ii) komerčně dostupné látky pokrývající většinu relevantních tříd chemických látek,

iii) zahrnutí silně leptavých (žíravých) látek i méně leptavých (žíravých) látek s cílem umožnit rozlišování založené na schopnosti leptat,

iv) volba chemických látek, s nimiž lze manipulovat v laboratoři bez jiných vážných nebezpečí, než je žíravost.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušený materiál je aplikován až 24 hodin na epidermální stranu terčíků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčíky kůže oddělují obě komory. Terčíky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28–30 dní. Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň (12). Pro potkany byla vybrána jako hraniční hodnota TER 5 kΩ a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum chemických látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla buď značně nad (často > 10 kΩ), nebo značně pod (často < 3 kΩ) touto hraniční hodnotou (12). Všeobecně platí, že materiály, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu. Použití jiných kožních přípravků nebo jiného přístroje si může vynutit změnu volby hraniční hodnoty a její další validaci.

Do zkušebního postupu je pro potvrzující zkoušku pozitivních výsledků včetně hodnot TER okolo 5 kΩ zařazen stupeň pro stanovení vázání barviva. Tento stupeň pro stanovení vázání barviva určuje, zda zvýšení permeability iontů je důsledkem fyzikálního porušení rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo se, že metoda TER s využitím kůže potkana umožňuje předvídat výsledky zjišťování leptavých účinků *in vivo s* králíky podle zkušební metody B.4 (2). Mělo by být uvedeno, že zkoušky *in vivo* na králících jsou vysoce konzervativní vzhledem k leptavým a dráždivým účinkům na kůži v porovnání se zkouškou na lidské kůži pomocí náplastí (15).

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Zvířata**

Vybraným druhem zvířat jsou potkani, protože citlivost jejich kůže k chemickým látkám v této zkoušce již byla prokázána (10). Stáří (v době odběru kůže) a kmen potkanů je zvláště důležitý pro zajištění toho, aby folikuly chlupů byly v latentní fázi, před začátkem růstu zralé srsti.

▼B

Hřbetní a boční srst mladých, přibližně 22denních samců nebo samic potkanů (z kmene příbuzného Wistaru nebo srovnatelného kmene) se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté umyjí opatrným otíráním, přičemž se oholená oblast ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů po druhém omytí, kdy se jejich *stratum corneum* po odstranění srsti zregeneruje.

1.5.2 **Příprava terčíků kůže**

Zvířata se humánně usmrtí ve stáří 28–30 dní; toto stáří je kritické. Z každého zvířete se poté odstraní hřbetní a boční kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Odeberou se terčíky kůže o průměru přibližně 20 mm. Kůže může být před použitím terčíků uchovávána, je-li prokázáno, že pozitivní a negativní kontrolní údaje jsou ekvivalentní údajům získaným s kůží čerstvou.

Každý terčík kůže se přeloží přes jeden z konců teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 2. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté pečlivě utěsní ke konci teflonové trubičky vrstvou vazelíny. Trubička držená pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého (154 mM) (obrázek 1). Terčík kůže musí být úplně ponořen do roztoku $MgSO_4$. Z jedné kůže potkana může být získáno 10 až 15 terčíků kůže.

Pro každou zvířecí kůži je před započetím zkoušky změřen elektrický odpor dvou terčíků kůže jako postup kontroly jakosti. Pro oba terčíky by měla být naměřena hodnota odporu větší než 10 kΩ, mají-li být pro tuto zkoušku použity ostatní terčíky. Pokud je hodnota odporu nižší než 10 kΩ, musí být ostatní terčíky z dotyčné kůže ze zkoušek vyřazeny.

1.5.3 **Aplikace zkoušených a kontrolních látek**

Pro každou studii by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. Měly by k tomu být použity terčíky kůže z téhož zvířete. Navrženými látkami pro pozitivní kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pro negativní kontrolu destilovaná voda.

Kapalná zkoušená látka (150 μL) se aplikuje stejnoměrně na epidermis uvnitř trubičky. Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla rovnoměrně pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 μL) a trubička se lehce protřepe. K zajištění maximálního styku látky s kůží může být nutné zahřát pevnou látku až na 30 °C, aby se zkoušená látka roztavila či změkla, nebo ji rozemlít na zrnitý materiál či prášek.

▼B

Pro každou zkoušenou a kontrolní látku se použijí tři terčíky kůže. Zkoušená látka se aplikuje po dobu 24 hodin při 20–23 °C. Zkoušená látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o teplotě nejvýše 30 °C.

1.5.4 **Měření TER**

Impedance kůže se měří jako TER. TER se měří nízkonapěťovým impedančním Wheatstoneovým můstkem pro střídavý proud (13). Všeobecné specifikace můstku: provozní napětí 1 až 3 V, sinusový nebo pravoúhlý tvar kmitů střídavého proudu frekvence 50–1 000 Hz a rozsah měření nejméně 0,1–30 kΩ. Můstek použitý ve validační studii měří induktanci, kapacitanci a odpor až do hodnot 2 000 H, 2 000 μF, a 2 MΩ, při frekvencích 100 Hz nebo 1 kHz, za použití sériových nebo paralelních hodnot. Pro účely měření TER v rámci zkoušky leptavých účinků se zaznamenávají hodnoty odporu při frekvenci 100 Hz a za použití sériových hodnot. Před měřením elektrického odporu se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70 % ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol z trubice vylije a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku síranu hořečnatého (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v kΩ/terčík kůže (obrázek 1). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 2. Svorka vnitřní elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku síranu hořečnatého nemění. Vnější elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi pružinovou svorkou a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 2), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu. Proto by vzdálenost mezi vnitřní elektrodou a terčíkem kůže měla být konstantní a minimální (1–2 mm).

Je-li naměřená hodnota vyšší než 20 kΩ, může to být způsobeno zbytky vrstvy zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a 10 sekund se protřepává. Roztok síranu hořečnatého se odstraní a měření se opakuje s čerstvým síranem hořečnatým.

Vlastnosti a rozměry zkušebního přístroje a použitý experimentální postup mohou ovlivnit naměřené hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ pro leptavé účinky byla odvozena na základě údajů zjištěných se specifickým přístrojem a postupem popsanými v této metodě. Pokud se změní podmínky zkoušky nebo je použit jiný přístroj, mohou platit jiné prahové a kontrolní hodnoty. Proto je nutné kalibrovat metodu a prahové hodnoty odporu zkoušením řady referenčních standardních materiálů vybraných z chemických látek použitých ve validační studii (4, 5), nebo z tříd chemických látek podobných zkoušeným látkám. Soubor vhodných referenčních chemických látek je uveden v tabulce 1.

▼B

1.5.5 **Metody stanovení vázání barviva**

Expozice kůže některým nežíravým materiálům může snížit odpor pod hraniční hodnotu 5 kΩ, v důsledku čehož je umožněn průnik iontů přes *stratum corneum* a snižuje se elektrický odpor (5). Např. neutrální organické látky a povrchově aktivní chemické látky (včetně detergentů, emulgátorů a jiných povrchově aktivních látek) mohou vést k odstranění kožních lipidů, čímž se bariéra stane pro ionty průchodnější. Proto pokud jsou při absenci zjevného poškození hodnoty TER zkoušených látek okolo 5 kΩ nebo jsou nižší než 5 kΩ, mělo by být provedeno posouzení průniku barviva na kontrolních a upravených tkáních ke zjištění, zda jsou naměřené hodnoty TER výsledkem zvýšené permeability kůže, nebo poleptání kůže (3, 5). V případě poleptání kůže, kdy *stratum corneum* je porušeno, barvivo sulforhodamin B při aplikaci na kůži rychle proniká a zbarvuje podložní tkáň. Toto konkrétní barvivo je stabilní v prostředí širokého rozsahu chemických látek a nemá na něj vliv níže popsaný extrakční postup.

1.5.5.1 *Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B*

Po měření TER se roztok síranu hořečnatého vylije z trubičky a kůže se pečlivě přezkoumá, zda není zjevně poškozena. Pokud zjevné velké poškození není patrné, aplikuje se na epidermální stranu každého terčíku kůže po dobu 2 hodin 150 μL 10 % roztoku (m/V) barviva sulforhodaminu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. EINECS 222-529-8; č. CAS 3520-42-1) v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 sekund omývají tekoucí vodou o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20mililitrové skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 minut protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje a pak se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30 % roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C.

Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 minut při 21 °C (při relativní odstředivé síle ~175 × g). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30 % (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (A) roztoku se měří přibližně při 565 nm.

1.5.5.2 *Výpočet obsahu barviva*

Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot absorbance A (5) (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže využitím vhodné kalibrační křivky a poté se vypočte jeho střední hodnota.

2. **ÚDAJE**

Hodnoty odporu (kΩ) a případně hodnoty středního obsahu barviva (μg/terčík) pro zkoušený materiál a také pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky (údaje z jednotlivých pokusů a jejich střední hodnoty spolu s jejich ± směrodatnou odchylkou), včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, a jejich jednotlivé a střední hodnoty.

▼B

2.1 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Střední hodnoty výsledků TER jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozmezí dané metody v dotyčné zkušební laboratoři. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou přijatelné hodnoty rozmezí odporu uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí odporu (kΩ)
pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	0,5–1,0
negativní	destilovaná voda	10–25

Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou pro uvedení

kontrolní látky doporučeny tyto přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (µg/terčík kůže)
pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	40–100
negativní	destilovaná voda	15–35

Zkoušená látka je pokládána za neleptající kůži (nežíravou):

i) je-li střední hodnota TER změřená pro dotyčnou zkoušenou látku větší než 5 kΩ, nebo

ii) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 kΩ a

— terčík kůže nevykazuje žádné zjevné poškození a

— střední obsah barviva v terčíku kůže je podstatně nižší než střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly.

Zkoušená látka je pokládána za leptající kůži (žíravou):

i) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 kΩ a terčík kůže je zjevně poškozen, nebo

ii) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 kΩ a

— terčík kůže není zjevně poškozen, ale

— střední obsah barviva v terčíku kůže je větší nebo roven střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 10M HCl jakožto pozitivní kontroly.

▼B

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

— chemický název (názvy), např. název podle IUPAC nebo CAS a číslo CAS, je-li známo,

— čistota a složení látky nebo přípravku (v hmotnostních procentech) a fyzikální vlastnosti,

— fyzikálně-chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, pH, stabilita, rozpustnost ve vodě, které jsou relevantní pro provedení studie,

— případná úprava zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřátí, rozemletí),

— stabilita, je-li známa.

Pokusná zvířata:

— použitý kmen a pohlaví,

— stáří zvířat použitých jako dárcovská zvířata,

— zdroj, podmínky přechovávání, výživa atd.,

— podrobnosti přípravy kůže.

Zkušební podmínky:

— kalibrační křivky zkušebního přístroje,

— kalibrační křivky pro zkoušku účinnosti vázání barviva,

— podrobnosti zkušebního postupu pro měření TER,

— případně podrobnosti zkušebního postupu pro stanovení vázání barviva,

— popis případných modifikací zkušebních postupů,

— popis použitých kritérií vyhodnocení.

Výsledky:

— údaje změřených hodnot TER a případně obsahu vázaného barviva pro jednotlivá zvířata a jednotlivé vzorky kůže, zpracované ve formě tabulky,

— popis jakýchkoli pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2) Zkušební metoda B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219–255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471–482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483–524.

6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.

8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st -2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507–512.

▼B

13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an inter-laboratory trial. Toxic. in Vitro 6, 191–194.

14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709–720.

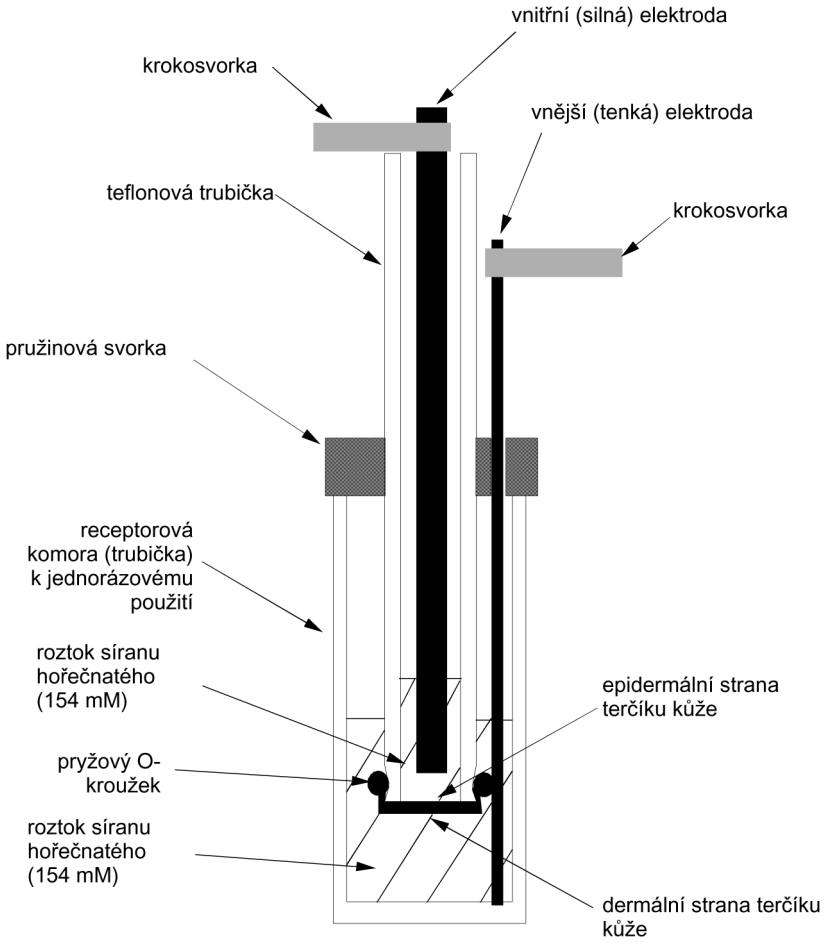
15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845–852.

16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7–17.

▼B

Obrázek 1

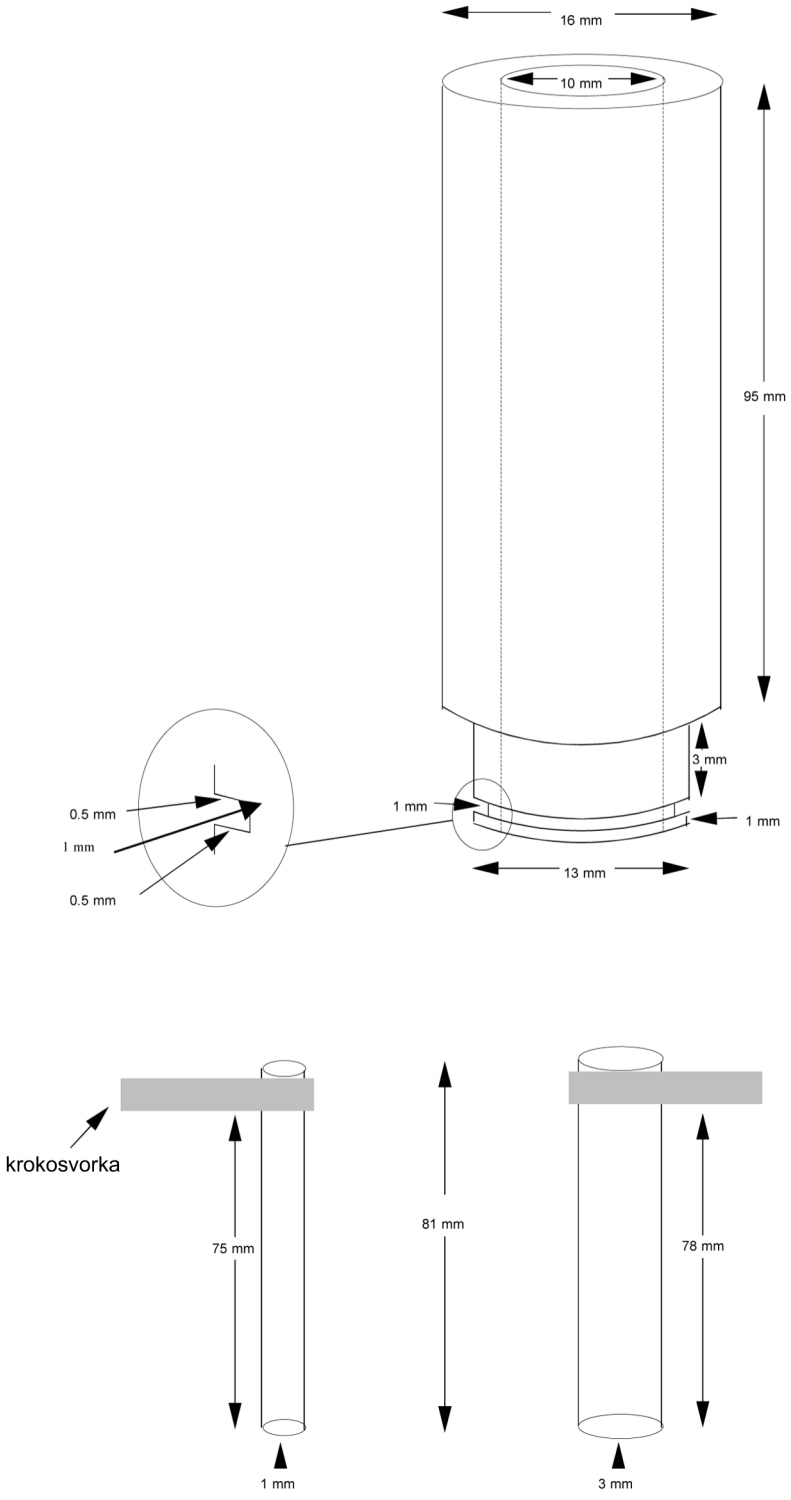
Přístroj pro zkoušku TER na kůži potkana



▼B

Obrázek 2

Rozměry teflonové a receptorové trubičky a použitých elektrod



▼B

Kritické faktory přístroje uvedeného výše:

— vnitřní průměr teflonové trubičky,

— taková délka elektrod vzhledem k teflonové trubičce a receptorové trubičce, aby se elektrody nedotýkaly terčíku kůže a aby standardní délka elektrody byla ve styku s roztokem $MgSO_4$,

— objem roztoku $MgSO_4$ v receptorové trubičce musí vzhledem k hladině v teflonové trubičce dávat takovou výšku kapaliny, jak je znázorněno na obrázku 1,

— terčík kůže musí být k teflonové trubičce připevněn tak, aby elektrický odpor představoval skutečnou míru vlastností kůže.

▼B

B.40a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU LIDSKÉ KŮŽE

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 431 (2004).

1.1 ÚVOD

Poleptáním kůže se rozumí nevratné poškození tkáně kůže po aplikaci zkoušeného materiálu (definované globálně harmonizovaným systémem klasifikace a označování látek a přípravků (GHS)) (1). Tato zkušební metoda nevyžaduje použití živých zvířat ani zvířecí tkáně pro stanovení leptavých účinků na kůži.

Posuzování leptavých účinků na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (2). Snaha o omezení bolesti a utrpení pokusných zvířat spojené s tímto postupem vedla k takové revizi zkušební metody B.4, která umožňuje stanovit poleptání kůže alternativními metodami *in vitro*, vylučujícími bolest a utrpení zvířat.

Prvním krokem k definování alternativních zkoušek, které by umožňovaly zkoušet leptavé účinky na kůži pro účely regulace, bylo provedení předvalidačních studií (3). Poté byla provedena řádná validační studie metod *in vitro* (6, 7, 8) pro posuzování leptavých účinků na kůži (4, 5). Závěr z těchto studií a z dalších publikací (9) vedl k doporučení, že pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* by mohly být použity tyto zkoušky (9, 10, 11, 12, 13): zkouška pomocí modelu lidské kůže (tato metoda) a zkouška transkutánního elektrického odporu (viz zkušební metoda B.40).

Validační studie uvádějí, že zkoušky s využitím modelů lidské kůže (3, 4, 5, 9) již umožňují spolehlivě rozlišovat mezi známými látkami kůži leptajícími (žíravými) a neleptajícími (nežíravými). Zkušební postup může rovněž umožnit rozlišení mezi látkami způsobujícími vážné a méně vážné poleptání kůže.

Zkouška popsaná v této metodě umožňuje identifikovat leptavé (žíravé) chemické látky a směsi. Dále umožňuje identifikaci neleptavých (nežíravých) látek a směsí, pokud je doložena důkaznými stanoveními založenými na dalších dostupných údajích (např. pH, vztahy mezi strukturou a aktivitou, údaje o vlivu na lidi nebo na zvířata) (1, 2, 13, 14). Zkouška obvykle neskýtá odpovídající údaje o dráždivých účincích na kůži ani neumožňuje rozčleňovat žíravé látky na podskupiny, jak to umožňuje globálně harmonizovaný systém klasifikace (GHS) (1).

Úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích se doporučuje provádět strategií postupného zkoušení, jak je uvedeno ve zkušební metodě B.4 (2) a jak je stanoveno globálně harmonizovaným systémem (GHS) (1). Tato strategie zkoušení zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži *in vitro* (jak je uvedeno v této metodě) a dráždivých účinků na kůži před uvážením zkoušek na živých zvířatech.

▼B

1.2 DEFINICE

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenas redukovat vitální barvivo MMT) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Tabulka 1

Referenční chemické látky

Název	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-1,2-diamin	201-155-9	78-90-0	silně žíravý
kyselina akrylová (kyselina prop-2-enová)	201-177-9	79-10-7	silně žíravá
2-terc-butylfenol	201-807-2	88-18-6	žíravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žíravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žíravý
kyselina oktanová (kyselina kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žíravá
4-amino-1H-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	nežíravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežíravý
fenethylbromid	203-130-8	103-63-9	nežíravý
tetrachlorethen	204-825-9	27-18-4	nežíravý
kyselina isostearová	250-178-0	30399-84-9	nežíravá
4-(methylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežíravý

Většina z uvedených látek je převzata ze seznamu látek vybraných pro mezinárodní validační studii ECVAM (4). Jejich výběr je založen na těchto kritériích:

i) stejný počet leptavých (žíravých) a neleptavých (nežíravých) látek,

ii) komerčně dostupné látky pokrývající většinu relevantních tříd chemických látek,

iii) zahrnutí silně leptavých (žíravých) látek i méně leptavých (žíravých) látek s cílem umožnit rozlišování založené na schopnosti leptat,

▼B

iv) volba chemických látek, s nimiž lze manipulovat v laboratoři bez jiných vážných nebezpečí, než je žíravost.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušený materiál je aplikován na trojrozměrný model lidské kůže sestávající se přinejmenším z rekonstruované epidermis a funkční rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit při specifikované expoziční době pokles životaschopnosti buněk (stanovený např. použitím zkoušky redukce MTT) pod definovanou prahovou úroveň. Podstata stanovení pomocí modelu lidské kůže je založena na hypotéze, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difuzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách.

1.4.1 **Postup**

1.4.1.1 *Modely lidské kůže*

Modely lidské kůže lze vyrobit nebo získat komerčně (např. modely EpiDerm™ a EPISKIN™) (16, 17, 18, 19) nebo je lze připravit či vyrobit ve zkušební laboratoři (20, 21). Uznává se, že využití lidské kůže podléhá vnitrostátním a mezinárodním etickým ohledům a podmínkám. Jakýkoli nový model by měl být validován (přinejmenším v rozsahu uvedeném v bodu 1.4.1.1.2). Modely lidské kůže použité pro tuto zkoušku musí splňovat následující podmínky:

1.4.1.1.1 Všeobecné podmínky modelu

K sestavení epitelu se musí použít lidské keratinocyty. Pod funkční rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) musí být více vrstev životaschopných epitelových buněk. Model kůže může mít také jako složku stromální vrstvu. *Stratum corneum* musí být vícevrstvé s nezbytným profilem lipidů, umožňující funkci robustní překážky odolávající rychlému pronikání cytotoxických značkovacích látek. Izolační vlastnosti modelu musí předcházet pronikání materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopných tkání. Proniknutí zkoušených chemických látek okolo *stratum corneum* by vedlo k chybnému modelování expozice kůže. Model kůže nesmí být kontaminován bakteriálně (mj. mykoplasmaty) ani houbami a plísněmi.

1.4.1.1.2 Podmínky funkčního modelu

Rozsah životaschopnosti je obvykle kvantifikován pomocí MTT nebo jiných metabolicky přeměněných vitálních barviv. V těchto případech by absorbance (A) extrahovaného (solubilizovaného) barviva negativní kontrolní tkáně měla být nejméně 20násobně vyšší než absorbance extrakčního rozpouštědla samotného (22). Negativní kontrolní tkáň musí být stabilní v kultuře (musí vést k podobným výsledkům měření životachopnosti) po dobu trvání expoziční doby zkoušky. *Stratum corneum* musí být dostatečně odolné, aby odolalo rychlému proniknutí některých cytotoxických značkovacích chemických látek (např. 1 % Triton X-100). Tuto vlastnost lze odhadnout pomocí expoziční doby nutné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) (např. pro modely EpiDerm™ a EPISKIN™ je tato doba > 2 hodiny). Pro tkáň by měla být prokázána reprodukovatelnost v čase a přednostně i mezilaboratorně. Kromě toho musí umožnit predikci leptavých účinků referenčních chemických látek (viz tabulka 1), pokud je vybrána ve zvoleném zkušebním postupu.

▼B

1.4.1.2 *Aplikace zkoušených a kontrolních látek*

Pro každý experiment (expoziční dobu), včetně kontrolních, se použijí dvě repliky tkáně. U kapalných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokrylo povrch kůže: musí být použito nejméně 25 μL/cm^2. U pevných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokrylo kůži, a zkoušená látka by měla být ovlhčena deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby byl zajištěn dobrý styk s kůží; pevné látky by měly být podle potřeby před aplikací rozemlety na prášek. Aplikační metoda musí být pro zkoušenou látku vhodná (5). Po uplynutí expoziční doby musí být zkoušený materiál z povrchu kůže pečlivě spláchnut vhodným pufrem, nebo 0,9 % roztokem NaCl.

Pro každou studii by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. Navrženými látkami pro pozitivní kontrolu jsou ledová kyselina octová nebo 8N KOH. Navrženými látkami pro negativní kontrolu jsou 0,9 % roztok NaCl nebo voda.

1.4.1.3 *Měření životaschopnosti buněk*

K měření životaschopnosti buněk lze používat pouze validované kvantitativní metody. Míra životaschopnosti musí být slučitelná s využíváním v třírozměrném modelu tkáně. Nespecifické vázání barviva nesmí rušit měření životaschopnosti. Proto nejsou vhodná barviva vážící proteiny a barviva nepodléhající metabolické konverzi (např. neutrální červeň). Nejčastěji se používá stanovení redukce MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř: č. EINECS 206-069-5, č. CAS 298-93-1)), pro niž bylo prokázáno, že poskytuje správné a reprodukovatelné výsledky (5), ale lze používat i jiné. Vzorek kůže se umístí do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3 až 1,0 mg/ml) při vhodné inkubační teplotě na dobu 3 hodin. Vzniklá sraženina modrého formazanu se poté extrahuje rozpouštědlem (isopropylalkoholem) a koncentrace formazanu se stanoví měřením absorbance A při vlnové délce 545 až 595 nm.

Chemický účinek zkoušeného materiálu na vitální barvivo může imitovat účinek buněčného metabolismu, čímž může dojít k nesprávnému odhadu životaschopnosti. Bylo pozorováno, že k tomu dochází, nebyl-li zkoušený materiál z kůže úplně odstraněn oplachováním (9). Jestliže zkoušený materiál působí přímo na vitální barvivo, musí být dodatečně zkontrolováno, zda zkoušené látky neruší stanovení životaschopnosti, a případně výsledky korigovat (9, 23).

2. **ÚDAJE**

Hodnoty absorbance A pro každou tkáň a vypočtené hodnoty životaschopnosti buněk v procentech pro zkoušený materiál a pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky, včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, středních a jednotlivých hodnot.

▼B

2.1 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Hodnoty absorbance A dosažené pro každý zkoušený vzorek lze použít k výpočtu relativní životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole, která je dohodou stanovena na úroveň 100 %. Hraniční procentuální podíl životaschopnosti buněk, kterým se rozlišují žíravé zkoušené materiály od nežíravých (nebo kterým se rozlišují různé třídy leptavých účinků), nebo statistické postupy použité k vyhodnocení výsledků a k identifikaci žíravých materiálů musí být jasně definovány a zdokumentovány, a musí být prokázána jejich vhodnost. Obecně jsou tyto hraniční hodnoty stanoveny během optimalizace zkoušky, testovány během předvalidační fáze a potvrzeny validační studií. Predikce leptavých účinků (žíravosti) je ve spojení s modelem EpiDerm™ například dána takto (9):

Zkoušená látka je pokládána za leptající kůži (žíravou):

i) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost nižší než 50 %, nebo

ii) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost vyšší nebo rovna 50 % a životaschopnost po 1 hodině expozice je nižší než 15 %.

Zkoušená látka je pokládána za neleptající kůži (nežíravou):

i) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost vyšší nebo rovna 50 % a životaschopnost po 1 hodině expozice je vyšší nebo rovna 15 %.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

— chemický název (názvy), např. název podle IUPAC nebo CAS a číslo CAS, je-li známo,

— čistota a složení látky nebo přípravku (v hmotnostních procentech),

— fyzikálně-chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, pH, stabilita, rozpustnost ve vodě, které jsou relevantní pro provedení studie,

— případná úprava zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřátí, rozemletí),

— stabilita, je-li známa.

Zdůvodnění modelu kůže a použitého postupu.

Zkušební podmínky:

— použitý buněčný systém,

— kalibrační údaje pro měřicí zařízení použité pro měření životaschopnosti buněk (např. spektrofotometr),

▼B

— úplné podkladové údaje pro konkrétní použitý model kůže včetně jeho validity,

— podrobnosti použitého zkušebního postupu,

— použité zkušební dávky,

— popis případných modifikací zkušebního postupu,

— odkazy na minulé údaje o použitém modelu,

— popis použitých kritérií pro vyhodnocení.

Výsledky:

— údaje z jednotlivých zkoušených vzorků, zpracované ve formě tabulky,

— popis dalších pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků.

Závěr.

4. **LITERATURA**

1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2) Zkušební metoda B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219–255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471–482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483–524.

6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.

8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, s. 371–401.

10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365–67.

12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26; 709–720.

15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55–63.

16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889–891.

17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211–225.

18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach; 133–140.

19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post – transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193; 310-319.

20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163–171.

21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747–756.

▼B

22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69–84.

23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVItro 15, 57–93.

▼B

B.41 ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 432 (2004).

1.1 ÚVOD

Fototoxicita je definována jako toxická odezva na látku aplikovanou na tělo, která je vyvolána nebo zvýšena (a je zjevná při nižších úrovních dávek) po následné expozici světlu nebo která je vyvolána ozářením kůže po systémovém podání látky.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky, který je vyvolán chemickou látkou excitovanou po expozici světlem. Zkouška vyhodnocuje fotocytotoxicitu z relativního snížení životaschopnosti buněk exponovaných zkoušené chemické látce v přítomnosti světla versus při jeho absenci. Látky identifikované touto zkouškou jsou pravděpodobně fototoxické *in vivo* po systémovém podání a po nanesení na kůži, nebo po nanesení na pokožku.

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek (1, 2, 3, 4). Jejich společným rysem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Grotthaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zvážením biologického zkoušení musí být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky podle Metodiky OECD TG 101. Vychází se z toho, že pokud je molární absorpční koeficient nižší než 10 l/mol/cm dotyčná chemická látka pravděpodobně není fotoreaktivní. Takové látky nemusí být zkouškou fototoxicity 3T3 NRU in vitro ani jinými biologickými zkouškami zkoušeny na nepříznivé fotochemické účinky (1, 5). Viz též přílohu 1.

V poslední době byla vyhodnocena spolehlivost a význam zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6, 7, 8, 9). Bylo prokázáno, že zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* umožňuje předpovídat akutní fototoxické účinky u zvířat a u člověka *in vivo*. Zkouška není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, např. neumožňuje zkoumat fotogenotoxicitu, fotoalergii nebo fotokarcinogenitu ani neumožňuje posuzovat fototoxický potenciál. Tato zkouška dále není určena ke zkoumání nepřímých mechanismů fototoxicity ani účinků metabolitů zkoušené látky nebo účinků směsí.

Zatímco použití metabolizujícího systému je obecným požadavkem při všech zkouškách *in vitro* určených pro posouzení genotoxického a karcinogenního potenciálu, ve fototoxikologii je dosud známo pouze málo příkladů, kdy je metabolická transformace nutná pro působení chemické látky jako fototoxinu *in vivo* nebo *in vitro*. Nepovažuje se tedy ani za nezbytné ani za vědecky zdůvodněné, aby byla předložená zkouška provedena se systémem aktivace metabolismu.

▼B

1.2 DEFINICE

Intenzita ozáření: intenzita ultrafialového (UV) nebo viditelného světla dopadajícího na povrch, měřená ve W/m^2 nebo mW/cm^2.

Dávka světelného záření: množství (intenzita × čas) ultrafialového (UV) nebo viditelného záření dopadajícího na povrch, vyjádřená v joulech (W × s) na plochu povrchu, např. J/m^2 nebo J/cm^2.

Vlnová pásma UV světla: označení doporučená komisí CIE (Mezinárodní komise pro osvětlení): UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm). Používají se rovněž jiná označení; jako hranice mezi UVB a UVA je často používána hodnota 320 nm a pásmo UVA může být rozděleno na UV-A1 a UV-A2 s hranicí kolem 340 nm.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. příjem vitálního barviva neutrální červeně do buněčných lysosomů) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

Relativní životaschopnost buněk: životaschopnost v poměru ke kontrolám s rozpouštědlem (negativní kontroly), které prošly celým postupem zkoušky (s ozářením i bez něj), ale nebyly exponovány zkoušeným chemickým látkám.

PIF (Photo-Irritation-Factor – fotoiritační faktor): faktor získaný srovnáním dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (IC_{50}) zkoušené látky, a to při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem a bez ozáření.

IC_{50}: koncentrace zkoušené látky, při níž se životaschopnost buněk sníží o 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect – střední světelný účinek): veličina odvozená z matematické analýzy průběhu křivek závislosti účinku na koncentraci získaných při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem v přítomnosti ozáření a bez něho.

Fototoxicita: akutní toxická reakce vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při zkoušení s expozicí necytotoxické dávce simulovaného slunečního světla a bez této expozice. Cytotoxicita je v této zkoušce vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně (NR) 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření (10). NR je slabé kationické barvivo, které nedifusně snadno proniká buněčnými membránami a akumuluje se mezibuněčně v lysosomech. Změny povrchu citlivých lysosomálních membrán způsobují ztrátu pevnosti lysosomů a další změny, které se postupně stávají nevratnými. Tyto změny vyvolané působením xenobiotik vedou ke snížení příjmu a vázání neutrální červeně. Je proto možné rozlišovat mezi životaschopnými, poškozenými nebo mrtvými buňkami, což je základem této zkoušky.

▼B

Buňky Balb/c 3T3 se 24 hodin kultivují, aby vytvořily monovrstvu. Dvě 96jamkové destičky na jednu zkoušenou chemickou látku se poté 1 hodinu preinkubují osmi různými koncentracemi zkoušených chemických látek. Poté je jedna ze dvou destiček exponována nejvyšší necytotoxickou dávkou ozáření, zatímco druhá destička se udržuje v temnu. U obou destiček se poté expoziční médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 hodinách inkubace je životaschopnost buněk stanovena pomocí příjmu neutrální červeně (NRU). Životaschopnost buněk je vyjádřena v procentech vzhledem k neexponované kontrole s rozpouštědlem a vypočte se pro každou zkušební koncentraci. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé odezvy získané při ozáření a bez ozáření, obvykle při hodnotě IC_{50}, tj. při koncentraci způsobující 50 % úbytek životaschopnosti buněk ve srovnání s neexponovanými kontrolami.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava**

1.4.1.1 *Buňky*

Při validační studii byla použita permanentní myší linie buněk fibroplastů – Balb/c 3T3, klon 31 – buď z banky ATCC (American Type Culture Collection) v Manassasu ve Virginii (USA) nebo z banky ECACC (European Collection of Cell Cultures) v Salisbury v hrabství Wiltshire (Spojené království), a je tudíž doporučeno získat buňky z dobře kvalifikovaných zdrojů buněk. Jiné buňky nebo buněčné linie mohou být při stejném zkušebním postupu použity za předpokladu, že jsou kultivační podmínky přizpůsobeny specifickým potřebám buněk, ale musí být prokázána jejich rovnocennost.

Buňky by měly být pravidelně kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty, a měly by být použity, pouze pokud kontaminovány nejsou (11).

Je důležité, aby byla citlivost buněk na UV pravidelně kontrolována postupem kontroly jakosti popsaným v této metodě. Vzhledem k tomu, že citlivost buněk na UVA může růst s počtem pasáží, měly by být použity buňky Balb/c 3T3 z pasáže s nejnižším dosažitelným počtem pasáží, nejlépe z nižší než sté pasáže (viz bod 1.4.2.2.2 a příloha 2).

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro rutinní buněčné pasážování a během zkušebního postupu by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky, např. u buněk Balb/c 3T3 se jedná o DMEM (Dulbeccova modifikace Eagleova média) obohacenou 10 % novorozeneckým telecím sérem, 4mM glutaminem, penicilinem (100 IU) a streptomycinem (100 µg/ml) a o inkubaci ve vlhčené atmosféře při 37 °C, 5–7,5 % CO_2 v závislosti na použitém pufru (viz druhý odstavec bod 1.4.1.4). Zvlášť důležité je, aby kultivační podmínky zajistily, aby byl buněčný cyklus uvnitř dosavadního rozpětí pro použité buňky nebo buněčné linie.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Buňky ze zmrazených kmenových kultur se nasadí do kultivačního média ve vhodné hustotě a alespoň jednou se pasážují před použitím ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

▼B

Při zkoušce fototoxicity se buňky nasazují do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence do konce zkoušky, tj. do okamžiku, kdy je po 48 hodin od nasazení stanovována životaschopnost. Pro buňky Balb/c 3T3 kultivované v 96jamkových destičkách je doporučeno inokulum 1×10^4 buněk na jamku.

Pro každou chemickou látku se buňky nasadí stejným způsobem do dvou oddělených 96jamkových destiček, které jsou poté souběžně podrobeny celému postupu zkoušky za stejných podmínek kromě doby, kdy je jedna z destiček ozářena (+ Irr) a druhá je udržována v temnu (– Irr).

1.4.1.4 *Příprava zkoušené látky*

Zkoušené látky musí být čerstvě připraveny vždy bezprostředně před použitím, pokud údaje neprokáží jejich stabilitu při skladování. Doporučuje se veškeré chemické kroky a počáteční úpravy buněk provádět při světelných podmínkách vylučujících fotoaktivaci nebo degradaci zkoušené látky před ozářením.

Zkoušené chemické látky se rozpustí ve fyziologickém roztoku, např. v Earlově fyziologickém roztoku (EBSS), nebo v jiných fyziologicky vyvážených pufrovaných roztocích, které nesmí obsahovat proteinové složky a složky absorbující světlo (např. pH indikátory a vitaminy), aby nerušily při ozařování. Protože během ozařování jsou buňky drženy přibližně 50 minut mimo inkubátor s CO_2, je nutno dbát na vyloučení alkalizace. Je-li použit slabý pufr jako např. EBSS, lze toho dosáhnout inkubováním buněk v prostředí se 7,5 % CO_2. Jsou-li buňky inkubovány pouze při 5 % CO_2, je nutno použít silnější pufr.

Zkoušené chemické látky s omezenou rozpustností ve vodě by měly být rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle. Použije-li se rozpouštědlo, musí být přítomné v konstantní koncentraci ve všech kulturách, tj. v negativní (rozpouštědlové) kontrole i ve všech koncentracích zkoušené chemické látky, a nesmí být při této koncentraci cytotoxické. Koncentrace zkoušené chemické látky musí být voleny tak, aby bylo vyloučeno srážení nebo zakalení roztoku.

Doporučenými rozpouštědly jsou dimethylsulfoxid (DMSO) a ethanol (EtOH). Vhodná mohou být i jiná málo cytotoxická rozpouštědla. Před použitím by měly být pro všechna rozpouštědla posouzeny jejich specifické vlastnosti, např. reakce se zkoušenou chemickou látku, potlačení fototoxických účinků, záchyt radikálů a/nebo chemická stabilita v rozpouštědle.

Rozpouštění může být usnadněno mícháním a/nebo ultrazvukem a/nebo zahřátím na vhodnou teplotu, pokud tím není dotčena stabilita zkoušené chemické látky.

▼B

1.4.1.5 *Podmínky ozařování*

1.4.1.5.1 Zdroj světla

Volba vhodného zdroje světla a filtrů je kritickým faktorem zkoušení fototoxicity. Záření v pásmu UVA a ve viditelném pásmu je obvykle spojováno s fototoxickými reakcemi *in vivo* (3, 12), zatímco záření v pásmu UVB je méně relevantní a je vysoce cytotoxické; cytotoxicita vzrůstá mezi 313 nm a 280 nm tisíckrát (13). Kritéria pro volbu vhodného světelného zdroje musí zahrnovat požadavek, aby zdroj světla vyzařoval světlo o vlnových délkách, které zkoušená chemická látka absorbuje (absorpční spektrum), a aby dávka světelného záření (dosažitelná po přijatelnou dobu expozice) byla dostatečná pro detekci známých fotocytotoxických chemických látek. Použité vlnové délky a dávky by dále neměly nadměrně poškozovat zkušební systém, např. emisí tepla (infračervená oblast).

Simulace slunečního světla solárními simulátory se považuje za optimální zdroj umělého světla. Distribuce zářivého výkonu filtrovaného solárního simulátoru by měla být blízká dennímu venkovnímu světlu uvedenému v literatuře (14). V solárních simulátorech se používá jak xenonová výbojka, tak vysokotlaká rtuťová halogenová výbojka (15). Druhá z nich má tu výhodu, že emituje méně tepla a je levnější, avšak sluneční světlo napodobuje méně dokonale než výbojka xenonová. Poněvadž všechny solární simulátory vyzařují významné množství UVB záření, měly by být vhodně filtrovány, aby byly vysoce cytotoxické vlnové délky UVB zeslabeny. Protože plastové materiály pro buněčné kultury obsahují UV stabilizátory, spektrum by mělo být měřeno po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. Nehledě na opatření přijatá k potlačení částí spektra filtrováním nebo na nevyhnutelné filtrační vlivy zařízení, spektrum zaznamenané za těmito filtry by se nemělo lišit od normalizovaného denního světla ve vnějším prostředí (14). Příklad spektrální distribuce filtrovaného záření solárního simulátoru použitého ve validační studii zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je uveden v literatuře (8, 16). Viz též dodatek 2 obrázek 1.

1.4.1.5.2 Dozimetrie

Intenzita světla (intenzita ozáření) se musí pravidelně před každou zkouškou fototoxicity kontrolovat za použití vhodného širokopásmového UV-metru. Intenzita by měla být měřena po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. UV-metr musí být pro daný zdroj kalibrován. Funkčnost UV-metru by měla být kontrolována a za tímto účelem se doporučuje použít druhý referenční UV-metr stejného typu, stejným způsobem kalibrovaný. V ideálním případě by měl být v delších časových odstupech použit k měření spektrální intenzity záření filtrovaného zdroje světla a ke kontrole kalibrace širokopásmového UV-metru spektroradiometr.

Dávka 5 J/cm^2 (změřená v pásmu UVA) byla shledána jako necytotoxická pro buňky Balb/c 3T3 a dostatečně silná k excitaci chemických látek pro vyvolání fototoxických reakcí (6, 17), např. pro dosažení 5 J/cm^2 po dobu 50 minut byla intenzita ozáření nastavena na 1,7 mW/cm^2. Viz dodatek 2 obrázek 2. Jestliže je použita jiná buněčná linie nebo jiný světelný zdroj, musí být dávka ozáření případně kalibrována, aby mohl být režim dávkování volen tak, aby nepoškozoval buňky a byl dostatečný k excitaci standardních fototoxinů. Doba světelné expozice se vypočte tímto způsobem:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dávka ozáření } (\text{J/cm}^2) \times 1\,000}{\text{intenzita ozáření } (\text{mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{Ws})$$

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Koncentrace zkoušené látky*

Rozmezí koncentrací chemických látek zkoušených se světlem (+ Irr) a bez světla (– Irr) by měly být náležitě stanoveny v experimentech pro zjištění rozmezí. Může být užitečné zjistit rozpustnost na počátku a po 60 minutách (nebo po době odpovídající době expozice), neboť rozpustnost se může měnit s časem nebo v průběhu expozice. pH buněčných kultur s přídavkem zkoušených látek by měla být v rozmezí 6,5–7,8, aby byla vyloučena toxicita způsobená nevhodnými kultivačními podmínkami nebo vysoce kyselými či zásaditými chemickými látkami.

Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by se měla nacházet v mezích fyziologických zkušebních podmínek, např. by měl být vyloučen osmotický stres či stres z pH. V závislosti na zkoušené chemické látce může být nutné brát v úvahu další fyzikálně-chemické vlastnosti jako faktory omezující nejvyšší zkušební koncentraci. U relativně nerozpustných látek, které nejsou toxické až do koncentrace nasycení, by měla být testována nejvyšší dosažitelná koncentrace. Obecně by mělo být vyloučeno srážení zkoušené látky při jakýchkoli zkušebních koncentracích. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 1 000 μg/ml; osmolarita by neměla překročit 10 mM. Měla by být použita geometrická řada ředění 8 koncentrací zkoušené látky s konstantním faktorem ředění (viz druhý odstavec bodu 2.1).

Pokud existují údaje (z experimentů pro zjištění rozmezí koncentrací) o tom, že zkoušená chemická látka není cytotoxická až do mezní koncentrace určené pro experiment v temnu (– Irr), ale je vysoce cytotoxická po ozáření (+ Irr), rozmezí koncentrací, které má být zvoleno pro experimenty s ozářením (+ Irr), se může lišit od rozmezí zvoleného pro experimenty v temnu (– Irr), má-li být splněn požadavek uspokojivé kvality údajů.

1.4.2.2 *Kontroly*

1.4.2.2.1 Citlivost buněk na záření, zjištění dosavadních údajů:

Citlivost buněk na zdroj světla by měla být pravidelně kontrolována (přibližně každá pátá pasáž) posouzením jejich životaschopnosti po expozici rostoucími dávkami ozáření. Při tomto posouzení by mělo být použito několik dávek ozáření, včetně úrovní podstatně vyšších, než jsou úrovně při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU. Tyto dávky se nejsnáze kvantifikují měřením UV složek světelného zdroje. Buňky se nasadí při intenzitě použité ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a příští den se ozáří. Životaschopnost buněk se poté stanoví o den později využitím příjmu neutrální červeně. Mělo by být prokázáno, že výsledná nejvyšší necytotoxická dávka (např. dávka ve validační studii 5 J/cm^2 (UVA)) byla dostatečná ke korektní klasifikaci referenčních chemických látek (tabulka 1).

▼B

1.4.2.2.2 Citlivost na záření, kontrola současné zkoušky:

Zkouška splňuje kritéria jakosti, pokud ozářené negativní/-rozpouštědlové kontroly vykazují životaschopnost více než 80 % v porovnání s neozářenými negativními/rozpouštědlovými kontrolami.

1.4.2.2.3 Životaschopnost rozpouštědlové kontroly

Absolutní absorbance ($A_{540\ NRU}$) neutrální červeně extrahované z rozpouštědlových kontrol naznačí, zda 1×10^4 buněk nasazených na jednu jamku zachovalo při růstu během dvou dnů zkoušky obvyklou dobu zdvojnásobení (doubling time). Zkouška splňuje kritérium přijatelnosti, jestliže střední hodnota $A_{540\ NRU}$ neexponovaných kontrol je $\geq$ 0,4 (tj. přibližně dvacetinásobek absorbance rozpouštědlového pozadí).

1.4.2.2.4 Pozitivní kontrola

Při každé zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* musí být souběžně zkoušena známá fototoxická chemická látka. Doporučen je chlorpromazin (CPZ). Pro CPZ zkoušený podle standardního postupu při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla definována tato kritéria přijatelnosti zkoušky: CPZ ozářený (+ Irr): IC_{50} = 0,1 až 2,0 μg/ml, pro CPZ neozářený (– Irr): IC_{50} = 7,0 až 90,0 μg/ml. Fotoiritační faktor (PIF) by měl být > 6. Měla by být sledována předcházející funkčnost této pozitivní kontroly.

Namísto chlorpromazinu mohou být použity jako souběžné pozitivní kontroly jiné fototoxické chemické látky vhodné z hlediska typu nebo rozpustnosti hodnocené chemické látky.

1.4.3 **Zkušební postup (6, 7, 8, 16, 17)**

1.4.3.1 *První den*

Do obvodových jamek 96jamkové mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury se odpipetuje po 100 μl kultivačního média (slepý pokus). Do zbývajících jamek se dávkuje po 100 μl buněčné suspenze s 1×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu (= 1×10^4 buněk na jamku). Pro každou řadu koncentrací jednotlivých zkoušených chemických látek a pro rozpouštědlovou a pro pozitivní kontrolu se připraví dvě destičky.

Buňky se inkubují 24 hodin (viz bod 1.4.1.2), dokud nedosáhnou semikonfluentní monovrstvy. Tato inkubační doba umožní regeneraci buněk, jejich přichycení a exponenciální růst.

1.4.3.2 *Druhý den*

Po inkubaci se kultivační médium z buněk dekantuje a důkladně promyje 150 μl pufrovaného roztoku použitého k inkubaci. Přidá se 100 μl pufru obsahujícího vhodnou koncentraci zkoušené chemické látky, nebo pouze rozpouštědlo (rozpouštědlová kontrola). Aplikuje se 8 různých koncentrací zkoušené chemické látky. Buňky se zkoušenou chemickou látkou se inkubují v temnu po dobu 60 minut (viz bod 1.4.1.2 a druhý odstavec bodu 1.4.1.4).

Jedna ze dvou destiček připravených pro každou z řady koncentrací zkoušené chemické látky a kontroly se zvolí, obvykle náhodně, pro stanovení cytotoxicity (– Irr) (tj. kontrolní destička) a jedna (tj. expoziční destička) pro stanovení fotocytotoxicity (+ Irr).

▼B

K provedení části zkoušky s ozářením (+ Irr) se buňky při pokojové teplotě po dobu 50 minut ozařují přes víčko 96jamkové destičky nejvyšší dávkou záření, která je necytotoxická (viz též dodatek 2). Neozářené destičky (– Irr) se ponechají 50 minut (= doba expozice světlem) v temnu při pokojové teplotě.

Zkušební roztok se odstraní a každá jamka se promyje dvakrát 150 µl pufrovaného roztoku použitého k inkubaci, ale neobsahujícího zkoušený materiál. Pufrovaný roztok se poté nahradí kultivačním médiem a inkubuje se (viz bod 1.4.1.2) přes noc (18–22 hodin).

1.4.3.3 *Třetí den*

1.4.3.3.1 Mikroskopické hodnocení

Buňky se prohlédnou pod mikroskopem s fázovým kontrastem vzhledem k jejich růstu, morfologii a neporušenosti monovrstvy. Zaznamenají se změny morfologie buněk a účinky na růst buněk.

1.4.3.3.2 Zkouška příjmu neutrální červeně

Buňky se promyjí 150 µl předehřátého roztoku pufru. Promývací roztok se opatrně odstraní poklepem. Přidá se 100 µl média bez séra (16) s koncentrací 50 µg/ml neutrální červeně (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin hydrochlorid; N^8,N^8,3-trimethyl-fenazin-2,8-diamin-hydrochlorid; č. EINECS 209-035-8; č. CAS 553-24-2; C.I. 50040) a inkubuje se 3 hodiny dle popisu v bod 1.4.1.2. Po inkubaci se médium NR odstraní a buňky se promyjí 150 µl pufru. Ten se dekantuje a zcela odstraní odsátím nebo odstředěním.

Přidá se přesně 150 µl čerstvě připraveného roztoku (49 dílů vody + 50 dílů ethanolu + 1 díl kyseliny octové) k odstranění NR.

Mikrotitrační destička se jemně 10 minut třepe na třepačce, dokud se NR z buněk nevylouží a nevytvoří homogenní roztok.

Spektrometrem se změří absorbance extraktu NR při 540 nm, přičemž se pro srovnání použije slepý pokus. Údaje se uloží ve vhodném formátu elektronického souboru pro následnou analýzu.

2. **ÚDAJE**

2.1 KVALITA A MNOŽSTVÍ ÚDAJŮ

Údaje ze zkoušky by měly umožnit smysluplnou analýzu závislosti odezvy na koncentraci získané při ozáření a bez něho, a je-li to možné, koncentraci zkoušené látky, při níž je životaschopnost buněk snížena na 50 % (IC_{50}). Je-li zjištěna cytotoxicita, měl by být rozsah koncentrací a interval mezi nimi nastaven tak, aby bylo možné proložit experimentálními údaji křivku.

Pro jasně pozitivní a jasně negativní výsledky (viz první odstavec bodu 2.3) může dostačovat primární experiment podpořený jedním nebo více předběžnými experimenty pro stanovení rozsahu dávek.

▼B

Neprůkazné, hraniční nebo nejasné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením (viz též druhý odstavec bodu 2.4). V těchto případech by měla být uvážena změna experimentálních podmínek. Změněné experimentální podmínky se mohou týkat rozmezí koncentrací nebo rozestupů mezi jednotlivými koncentracemi, preinkubační doby a doby expozice ozářením. Kratší doba expozice může být vhodná u chemických látek nestálých ve vodě.

2.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

S cílem umožnit vyhodnocení údajů může být vypočten fotoiritační faktor (PIF) a střední světelný účinek (MPE).

Pro výpočet parametrů fotocytotoxicity (viz níže) musí být soubor diskrétních hodnot závislosti odezvy na koncentraci aproximován vhodnou spojitou křivkou závislosti odezvy na koncentraci (vhodným modelem). Prokládání dat křivkou je běžně prováděno metodou nelineární regrese (18). Pro posouzení vlivu variability údajů na proloženou křivku se doporučuje postup *bootstrap*.

Fotoiritační faktor (PIF) se vypočte ze vzorce:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-\text{Irr})}{IC_{50}(+\text{Irr})}$$

Pokud nelze vypočíst IC_{50} v přítomnosti a při absenci ozáření, nelze pro zkoušený materiál fotoiritační faktor PIF stanovit.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Střední světelný účinek (MPE) je založen na srovnání úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci (19). MPE je definován jako vážený průměr reprezentativního souboru hodnot světelného účinku:

Světelný účinek při koncentraci C (PE_c) je definován jako součin účinku odezvy RE_c a účinku dávky DE_c tj. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Účinek odezvy RE_c je rozdíl mezi odezvou pozorovanou při absenci a v přítomnosti světla, tj. $RE_c = R_c (-\text{Irr}) - R_c (+\text{Irr})$. Účinek dávky je dán vzorcem:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kde C* představuje ekvivalentní koncentraci, tj. koncentraci, při které se odezva v přítomnosti světla + Irr rovná odezvě při absenci světla – Irr při koncentraci C. Pokud nelze ekvivalentní koncentraci C* určit, protože hodnoty odezvy $R_C(+\text{Irr})$ křivky jsou soustavně vyšší nebo nižší než hodnoty $R_C(-\text{Irr})$), je účinek dávky stanoven na hodnotu 1. Váhové faktory w_i jsou dány nejvyšší hodnotou odezvy, tj. $w_i = \text{MAX}\ \{R_i (+\text{Irr}), R_i (-\text{Irr})\}$. Koncentrační síť C_i je volena tak, aby v každém koncentračním intervalu definovaném hodnotami koncentrací použitými v experimentu byl stejný počet bodů. Výpočet středního světelného účinku je omezen na nejvyšší hodnoty koncentrací, při nichž alespoň jedna z obou křivek stále ještě vykazuje odezvu nejméně 10 %. Pokud je tato maximální koncentrace vyšší než nejvyšší koncentrace použitá v + Irr experimentu, je na zbývající části + Irr křivky odezva kladena jako rovná nule (= 0). V závislosti na tom, zda je, či není hodnota MPE větší než vhodně zvolená hraniční hodnota (MPE_c = 0,15), zkoušená chemická látka je, či není klasifikována jako fototoxická.

▼B

Program pro výpočet parametrů PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Na základě validační studie (8) lze předpovědět, že zkoušená látka s PIF < 2 či MPE < 0,1„není fototoxická“. Hodnoty PIF > 2 a < 5 či MPE > 0,1 a < 0,15 předpovídají: „pravděpodobně fototoxická“; a PIF > 5 či MPE > 0,15 předpovídají: „fototoxická“.

V laboratoři zavádějící prvně toto stanovení by referenční materiály uvedené v tabulce 1 měly být odzkoušeny před zkoušením zkušebních látek ke stanovení fototoxicity. Naměřené hodnoty PIF a MPE by měly být blízké hodnotám uvedeným v tabulce 1.

Tabulka 1

Chemický název	č. EINECS	č. CAS	PIF	MPE	Absorpční pík	Rozpouštědlo ([1])
amiodaron-hydrochlorid	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (rameno)	ethanol
chlorpromazin-hydrochlorid	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	ethanol
norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitril
anthracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
protoporfyrin IX, disodná sůl	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	ethanol
L-histidin		[7006-35-1]	žádný PIF	0,05–0,10	211 nm	voda
2,2'-methylen-bis(3,4,6-trichlorfenol); hexachlorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (rameno)	ethanol
natrium-dodecyl-sulfát	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	neabsorbuje	voda

([1]) Rozpouštědlo použité pro měření absorpce.

2.4 INTERPRETACE ÚDAJŮ

Jsou-li fototoxické účinky pozorovány pouze při nejvyšších zkoušených koncentracích (zvláště v případě zkoušených chemických látek rozpustných ve vodě), mohou být pro posouzení nebezpečnosti nezbytné další úvahy. Ty se mohou týkat údajů o absorpci kůží a akumulaci chemické látky v kůži a/nebo údajů z jiných zkoušek, např. ze zkoušek dotyčné chemické látky *in vitro* za použití zvířecí nebo lidské kůže či jejich modelů.

▼B

Není-li toxicita prokázána (+ Irr a – Irr) a jsou-li koncentrace, které by mohly být zkoušeny, omezeny malou rozpustností, není patrně zkouška pro zkoušenou látku vhodná a mělo by být zváženo potvrzující zkoušení za použití např. jiného modelu.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat přinejmenším tyto informace:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje, obecné generické názvy a čísla podle IUPAC a CAS, jsou-li známa,

— fyzikální vlastnosti a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti důležité pro provedení studie,

— UV/VIS absorpční spektrum,

— stálost a fotostabilita, jsou-li známy.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— rozpustnost zkoušené chemické látky v rozpouštědle,

— procentuální koncentrace rozpouštědla v aplikačním médiu.

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— číslo buněčné pasáže, je-li známo,

— citlivost buněk na záření stanovená ozařovacím zařízením použitým ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Zkušební podmínky (1); *inkubace před aplikací a po ní*:

— typ a složení kultivačního média,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2; teplota; vlhkost),

— délka inkubace (zpracování před inkubací a po ní).

Zkušební podmínky (2); *aplikace chemické látky*:

— zdůvodnění výběru koncentrací zkoušené chemické látky použitých jak při ozáření, tak bez něj,

— v případě, že zkoušená chemická látka vykazuje omezenou rozpustnost a není cytotoxická: zdůvodnění nejvyšší zkušební koncentrace,

— typ a složení aplikačního média (pufrovaný fyziologický roztok),

— délka aplikace chemické látky.

Zkušební podmínky (3); *ozáření*:

— zdůvodnění výběru použitého zdroje světla,

▼B

— výrobce a typ zdroje světla a radiometru,

— spektrální charakteristiky ozáření ze zdroje světla,

— charakteristiky propustnosti a absorpce použitého filtru (použitých filtrů),

— charakteristiky radiometru a podrobnosti o jeho kalibraci,

— vzdálenost zdroje světla od zkoušeného systému,

— intenzita ozáření UVA v této vzdálenosti, vyjádřená v mW/cm^2,

— délka expozice UV/VIS světlu,

— dávka UVA záření (intenzita × čas), vyjádřená v J/cm^2,

— teplota buněčných kultur během ozařování a teplota buněčných kultur souběžně udržovaných v temnu.

Zkušební podmínky (4); *zkouška životaschopnosti příjmem neutrální červeně*:

— složení aplikačního média neutrální červeně,

— doba inkubace neutrální červeně,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2; teplota; vlhkost),

— podmínky extrakce neutrální červeně (extrakční činidlo; délka extrakce),

— vlnová délka použitá pro spektrofotometrický odečet absorbance neutrální červeně,

— druhá (referenční) vlnová délka, je-li použita,

— složení slepého roztoku pro spektrometrii, je-li použit.

Výsledky:

— životaschopnost buněk získaná při každé koncentraci zkoušené chemické látky vyjádřená v procentech střední životaschopnosti souběžných rozpouštědlových kontrol,

— křivky koncentrační závislosti odezvy (koncentrace zkoušené chemické látky versus relativní životaschopnost buněk) získané při souběžných experimentech + Irr a – Irr,

— analýza křivek koncentrační závislosti odezvy; je-li to možné, výpočet hodnot / IC_{50} (+ Irr) a IC_{50} (– Irr),

— srovnání obou křivek koncentrační závislosti odezvy získaných s ozářením a bez něho, a to buď výpočtem fotoiritačního faktoru (PIF), nebo výpočtem středního světelného účinku (MPE),

— kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná rozpouštědlová kontrola:

— absolutní životaschopnost (absorbance extraktu NR) ozářených a neozářených buněk,

— dosavadní údaje pro negativní a rozpouštědlovou kontrolu; střední hodnoty a směrodatné odchylky,

— kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná pozitivní kontrola:

▼B

— IC_{50}(+ Irr) a IC_{50}(– Irr) a PIF/MPE pozitivní kontrolní chemické látky,

— dosavadní údaje pozitivní kontrolní chemické látky: IC_{50}(+ Irr) a IC_{50}(– Irr) a PIF/MPE; střední hodnoty a směrodatné odchylky.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, s. 79–110.

5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, s. 515–530.

13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275.

16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 stran.

17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

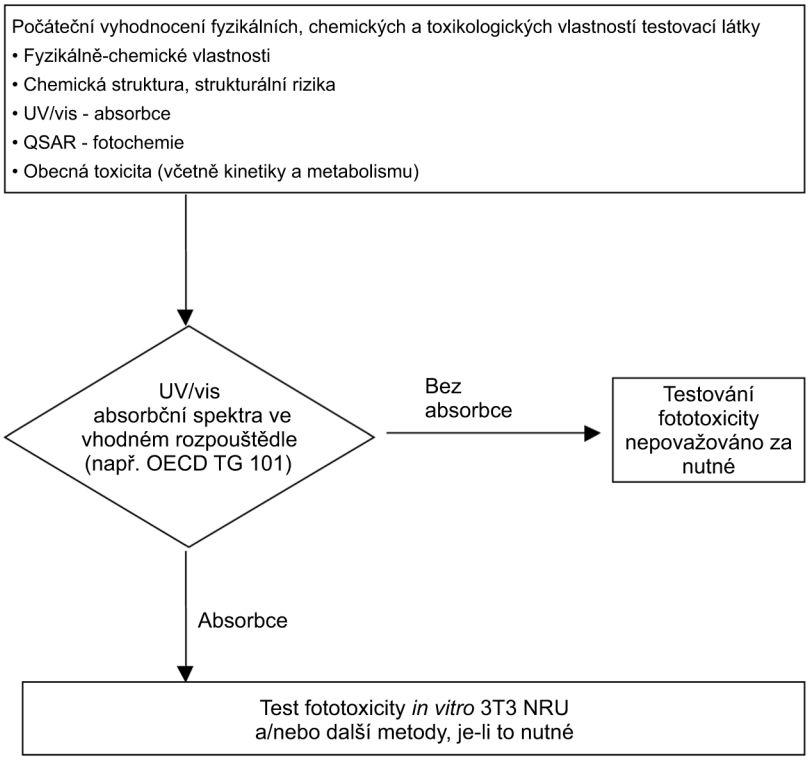
19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html.

▼B

DODATEK 2

Role zkoušky fototoxicity 3T3 NRU v postupném zkoušení fototoxicity chemických látek

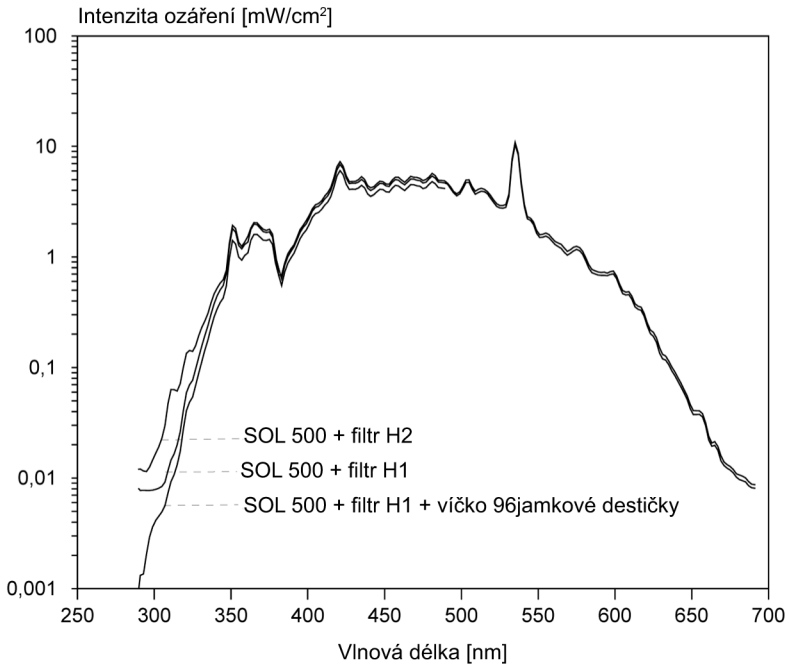


▼B

DODATEK 2

Obrázek 1

Spektrální distribuce výkonu filtrovaného solárního simulátoru



(viz druhý odstavec bodu 1.4.1.5)

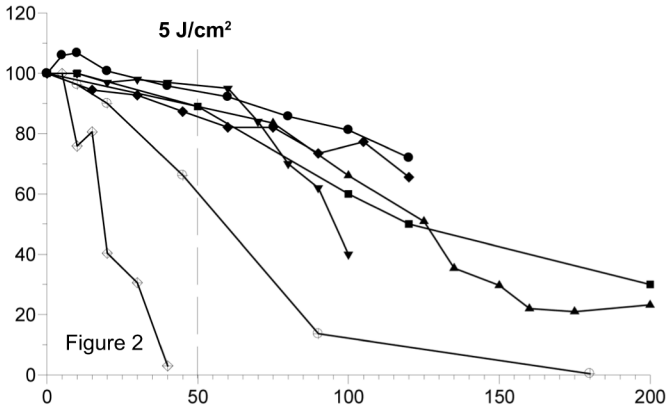
Obrázek 1 uvádí příklad přijatelné spektrální distribuce intenzity ozáření filtrovaného solárního simulátoru. Pochází ze zdroje dopovaného halidy kovů, použitého ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU (6, 8, 17). Je ukázán účinek dvou různých filtrů a dodatečný filtrační účinek víčka 96jamkové destičky pro kultivaci buněk. Filtr H2 byl použit pouze ve zkušebních systémech tolerantních k vyšší dávce UVB (zkouška modelu kůže a fotohemolytická zkouška červených krvinek). Pro zkoušku fototoxicity 3T3 NRU byl použit filtr H1. Obrázek ukazuje, že dodatečný filtrační účinek víčka destičky je pozorován hlavně v oblasti UVB, přičemž víčkem proniká stále ještě dostatečné množství UVB ze spektra intenzity ozáření k excitování chemických látek obvykle absorbujících v UVB oblasti, jako amiodaron (viz tabulka 1).

▼B

Obrázek 2

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření (měřená v oblasti UVA)

Životaschopnost buněk (v % úrovně příjmu neutrální červeně v kontrole v temnu)



doba ozáření (v minutách)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(viz bod 1.4.1.5.2 druhý odstavec; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření solárním simulátorem použitým ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU, naměřená v UVA oblasti. Obrázek znázorňuje výsledky změřené v sedmi různých laboratořích v předvalidační studii (1). Zatímco dvě křivky označené neplnými symboly byly získány se staršími buňkami (s vyšším počtem pasáží), které musely být nahrazeny novými buňkami, křivky s plnými symboly představují buňku s přijatelnou tolerancí k ozáření.

Z těchto údajů byla odvozena nejvyšší necytotoxická dávka ozáření 5 J/cm^2 (svislá čárkovaná čára). Vodorovná čárkovaná čára představuje navíc maximální přijatelný účinek ozáření uvedený v bodu 1.4.2.2.

▼M3

B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a na nich založené zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. Již dříve byla přijata původní zkušební metoda (ZM) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429; kapitola B.42 této přílohy) (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná metoda LLNA je založena na posouzení zkušeností a vědeckých údajů (12). Jedná se o druhou ZM, která je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Druhá zkušební metoda (tzn. podle zkušební metodiky OECD č. 406 nebo kapitoly B.6 této přílohy) využívá zkoušky na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA poskytuje oproti metodě uvedené v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13) určité výhody, pokud jde o dobré životní podmínky zvířat. Tato aktualizovaná zkušební metoda LLNA obsahuje sadu standardů funkčnosti (dodatek 1), které lze používat k posouzení stavu validace nových a/nebo modifikovaných zkušebních metod, které jsou funkčně a mechanicky podobné metodě LLNA, v souladu se zásadami uvedenými v Pokynu OECD č. 34 (14).

2. Metoda LLNA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky pro zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) jsou vhodné také pro metodu LLNA (6) (8) (15). V této ZM je jako alternativa popsána také redukovaná metoda LLNA (rLLNA), při které by se mohlo používat až o 40 % méně zvířat (16) (17) (18). Metodu rLLNA lze použít, když právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu metody LLNA popsané v této ZM. Predikce negativního výsledku by měla být založena na všech dostupných informacích popsaných v odstavci 4. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou v rozporu s původním očekáváním získány při použití metody rLLNA pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky. Metoda rLLNA by se neměla používat k zjišťování nebezpečnosti látek, které se používají při zkouškách senzibilizace kůže, pokud jsou zapotřebí informace ohledně závislosti odezvy na dávce, například při podrobném dílčím třídění látek pro účely nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí nebo pro účely globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemických látek OSN.

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 2.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Metoda LLNA představuje alternativní metodu pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA měla používat ve všech případech namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené

▼M3

látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace by se měly posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA – viz odstavec 5), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA je metodou *in vivo*, a tudíž taková neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Tato metoda však umožňuje snížit počet zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho metoda LLNA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace. Metoda LLNA je založena na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) metoda LLNA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (13). Díky tomu metoda LLNA snižuje bolest a utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406, je třeba si uvědomit, že existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (13) (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže [jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek] (19) (20) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (21). Na základě omezené validační databáze, která se skládala převážně z pesticidních přípravků, je pravděpodobnější, že u těchto druhů zkoušených látek poskytne pozitivní výsledek metoda LLNA nežli zkouška na morčatech (22). Avšak při testování přípravků by se dalo uvažovat o možnosti použít podobné látky se známými výsledky jakožto srovnávací látky, které prokáží, že metoda LLNA funguje správně (viz odstavec 16). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Základní podstata metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a účinnosti aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním střední proliferace u každé zkušební skupiny se střední proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr střední proliferace u každé z exponovaných skupin ke střední proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být větší nebo rovna třem, aby bylo zařazení zkoušené látky mezi potenciální senzibilizátory kůže oprávněné. Zde popsané postupy jsou založeny na použití radioaktivního značení *in vivo* k měření zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. K posouzení počtu proliferujících buněk však lze použít i jiné ukazatele za předpokladu, že jsou zcela splněny požadavky standardů funkčnosti (viz dodatek 1).

▼M3

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myší z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % střední hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (23), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Pozitivní kontrolu při každé studii také vyžadují některé regulační orgány, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 3 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce

▼M3

byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 20 by byla příliš velká). K upřednostňovaným látkám, které se používají jako pozitivní kontrola, patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1) a 5 % roztok 2-sulfanylbenzothiazolu (CAS 149-30-4) v *N,N*-dimethylformamidu (viz dodatek 1, tabulka 1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (12).

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (24). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

▼M3

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–14). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (3) a (5). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (3) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21–24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (19), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo komerční přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 35). Kromě toho je vhodné posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (12). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Souhrnné údaje za všechna zvířata mohou být nicméně některými regulačními orgány považovány za přijatelné, přičemž v takových situacích se mohou uživatelé rozhodnout, zda zvolí individuální nebo souhrnné údaje.

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

▼M3

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění kůže je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30))32) (33) (34).

24. O systémové toxicitě (35) (36) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo jeví známky silného a trvalého utrpení, by se měla humánně usmrtit 37).

▼M3

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).

— *Den 2 a den 3:* Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

— *Den 4 a den 5:* Žádná aplikace.

— *Den 6:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchne 250 µl fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS) obsahujícího 20 µCi ($7{,}4\times10^5$ Bq) [^{3}H]thymidinu (tritiovaného na methylu). Jinou možností je všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250 µl PBS obsahujícího 2 µCi ($7{,}4\times10^4$ Bq) [^{125}I]joddeoxyuridinu a 10^{-5} M fluordeoxyuridinu. O pět hodin (5 hod.) později se zvířata humánně usmrtí. U každého zvířete se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se v PBS (individuální přístup) nebo se lymfatické uzliny vyjmou na obou stranách u všech myší z celé zkušební skupiny a společně se uloží do PBS (přístup založený na sdružení exponované skupiny). Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (12). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

Příprava buněčných suspenzí

26. Jednobuněčná suspenze obsahující buňky vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší a pocházejících od jednotlivých zvířat nebo od celé exponované skupiny se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 µm sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze. Buňky lymfatických uzlin se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a jejich DNA se nechá vysrážet s 5 % kyselinou trichloroctovou při 4 °C po dobu 18 hod. (3). Sediment se buď resuspenduje v 1 ml kyseliny trichloroctové a přemístí do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity ^{3}H, nebo se přenese přímo do zkumavek pro měření aktivity ^{125}I.

Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)

27. Inkorporace [^{3}H]thymidinu se měří β-scintilační metodou a vyjadřuje se počtem rozpadů za minutu (DPM). Inkorporace [^{125}I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity ^{125}I a rovněž se vyjadřuje v DPM. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v DPM na zvíře (individuální přístup) nebo v DPM na zkušební skupinu (sdružený přístup).

Redukovaná metoda LLNA

28. V určitých situacích, kdy právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, lze použít volitelný protokol zkoušky rLLNA (16) (17) (18) vyžadující menší počet zvířat, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu LLNA popsané v této ZM. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou získány pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky.

▼M3

29. Snížení počtu dávkových skupin je jediný rozdíl mezi protokoly zkušebních metod LLNA a rLLNA, a proto zkouška rLLNA neposkytuje informace o závislosti odezvy na dávce. Proto by se metoda rLLNA neměla používat, když je nutno získat informace o závislosti odezvy na dávce. Stejně jako při vícedávkové zkoušce LLNA by měla hodnocená koncentrace látky zkoušené metodou rLLNA být maximální koncentrací, která nevyvolává zjevnou systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší (viz odstavec 18).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

30. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (37).

Hodnoty tělesné hmotnosti

31. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

32. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako index stimulace (SI). Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty DPM na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty DPM na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1. Při sdruženém přístupu se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované radioaktivity u jednotlivých exponovaných skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI.

33. Výsledek se považuje za pozitivní, když SI $\geq$ 3. Avšak při rozhodování, zda prohlásit hraniční výsledek za pozitivní, lze použít rovněž intenzitu odezvy na dávku, statistickou významnost a shodnost odezvy při použití rozpouštědla/vehikula a při použití pozitivní kontroly (4) (5) (6).

34. Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, měla by se věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími a. s.pekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (7).

35. Shromažďování údajů o radioaktivitě na úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

▼M3

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

36. Údaje by se měly shrnout do tabulky. Při použití individuálního přístupu se uvedou hodnoty DPM získané za jednotlivá zvířata, průměrná hodnota DPM na zvíře za celou skupinu, příslušný chybový výraz (např. směrodatná odchylka – SD, směrodatná odchylka průměrných hodnot – SEM) a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem. Při použití sdruženého přístupu se uvedou průměrné/mediánové hodnoty DPM a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu ve srovnání oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem.

Protokol o zkoušce

37. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin zkoušených v dotyčné laboratoři,

▼M3

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— tabulka hodnot DPM a hodnot SI od jednotlivých myší (individuální přístup) nebo průměrných/mediánových hodnot (sdružený přístup) za každou exponovanou skupinu,

— průměrná hodnota DPM na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu při použití individuálního přístupu,

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin při použití individuálního přístupu,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node a. s.say; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node a. s.say: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node a. s.say: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node a. s.say: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node a. s.say: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for a. s.sessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node a. s.say: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf].

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. K dispozici na adrese: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute-tox/Tox_workshop.htm].

(37) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Dodatek 1

Standardy funkčnosti k posouzení navrhovaných podobných nebo modifikovaných zkušebních metod LLNA pro zjišťování senzibilizace kůže

ÚVOD

1. Účelem standardů funkčnosti je stanovit základ, podle něhož lze určit, zda nové zkušební metody, a to jak chráněné (chráněné autorskými právy, chráněné ochrannými známkami, registrované), tak nechráněné, mají dostatečnou přesnost a spolehlivost pro konkrétní zkušební účely. Tyto standardy funkčnosti, založené na validovaných a uznávaných zkušebních metodách, lze používat k hodnocení spolehlivosti a přesnosti jiných podobných metod (hovorově označovaných jako zkoušky typu „me-too“), které jsou založeny na podobných vědeckých zásadách a měří nebo predikují tentýž biologický nebo toxický účinek (14).

2. Před přijetím modifikovaných metod (tzn. navrhovaných možných vylepšení schválené zkušební metody) je třeba provést posouzení, které určí dopad navrhovaných změn na funkčnost zkoušky a také míru, v jaké tyto změny ovlivňují údaje, jež jsou k dispozici pro další složky procesu validace. V závislosti na počtu a povaze navrhovaných změn, na výsledných údajích a podkladech pro tyto změny by měly být navrhované metody podrobeny buď témuž procesu validace, jaký je stanoven pro novou zkušební metodu, nebo případně omezenému posouzení spolehlivosti a relevantnosti za použití stávajících standardů funkčnosti (14).

3. Podobné nebo modifikované metody navržené k použití v rámci této ZM by měly být za účelem zjištění jejich spolehlivosti a přesnosti vyhodnoceny za použití chemických látek, které zastupují celou škálu výsledků zkoušky LLNA. Aby se zabránilo neoprávněnému využívání zvířat, důrazně se doporučuje, aby vývojoví pracovníci, kteří model koncipují, konzultovali příslušné orgány před zahájením validačních studií v souladu se standardy funkčnosti a pokyny uvedenými v této ZM.

4. Tyto standardy funkčnosti jsou založeny na harmonizovaných standardech funkčnosti vypracovaných výborem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) pro posuzování validity podobných nebo modifikovaných verzí metody LLNA. Standardy funkčnosti jsou tvořeny zásadními složkami zkušební metody, doporučenými srovnávacími látkami a požadavky na přesnost a spolehlivost, jež by navrhovaná metoda měla splňovat nebo převyšovat.

I. **Zásadní složky zkušební metody**

5. Aby se zajistilo, že podobná nebo modifikovaná metoda LLNA je funkčně a mechanicky analogická s metodou LLNA a měří tentýž biologický účinek, měl by protokol zkušební metody obsahovat tyto složky:

— zkoušená látka se myši aplikuje lokálně na obě uši,

— proliferace lymfocytů by se měla měřit v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky,

— proliferace lymfocytů by se měla měřit během indukční fáze senzibilizace kůže,

▼M3

— u zkoušených látek by se měla nejvyšší zvolená dávka rovnat maximální koncentraci, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší. U pozitivních srovnávacích látek by měla být nejvyšší dávka alespoň tak vysoká jako hodnoty EC3 odpovídající srovnávací látky pro metodu LLNA (viz tabulka 1), aniž by vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší,

— v každé studii by měly být zahrnuty souběžné kontroly s vehikulem a případně by se měla použít také souběžná pozitivní kontrola,

— na každou dávkovou skupinu by se měla použít alespoň čtyři zvířata,

— lze shromažďovat údaje za jednotlivá zvířata nebo souhrnné údaje.

Není-li některé z těchto kritérií splněno, potom nelze tyto standardy funkčnosti k validaci podobné nebo modifikované metody použít.

II. **Minimální seznam srovnávacích látek**

6. Harmonizované standardy funkčnosti vypracované výborem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) uvádějí 18 minimálních srovnávacích látek, které by se měly používat, a čtyři volitelné srovnávací látky (tzn. látky, které v rámci metody LLNA poskytují buď falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky ve srovnání s výsledky zkoušek na lidech a na morčatech (podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13), a proto umožňují prokázat stejnou nebo lepší funkčnost než metoda LLNA) uvedené ve standardech funkčnosti pro metodu LLNA. Kritéria výběru pro určení těchto chemických látek byla následující:

— srovnávací látky uvedené v seznamu zastupovaly druhy látek, u nichž se zpravidla zjišťuje jejich potenciál způsobovat senzibilizaci kůže a řadu reakcí, které lze měřit nebo predikovat pomocí metody LLNA,

— látky měly jasně definovanou chemickou strukturu,

— pro každou látku byly k dispozici údaje ze zkoušek na morčatech za použití metody LLNA (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) a (pokud možno) údaje ze zkoušek na lidech a

— látky byly snadno dostupné z komerčního zdroje.

Doporučené srovnávací látky jsou uvedeny v tabulce 1. Studie za použití navrhovaných srovnávacích látek by se měly hodnotit ve vehikulu, s nímž jsou uvedeny v tabulce 1. V situacích, kdy některá uvedená látka nemusí být k dispozici, lze při odpovídající zdůvodnění použít jiné látky, které splňují uvedená kritéria výběru.

▼M3

Tabulka 1

Doporučené Srovnávací látky pro standardy FUNKčnosti k metodě LLNA

Číslo	Chemické látky (1)	Číslo CAS	Skup.	Veh. (2)	EC3 (v %) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
1	5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	kap.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	pev.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,09-4	+/+	+/+
3	benzen-1,4-diamin	106-50-3	pev.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	pev.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenol	97-54-1	kap.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-sulfanylbenzothiazol	149-30-4	pev.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	kap.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	kap.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenol	97-53-0	kap.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenyl-benzoát	93-99-2	pev.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	3-fenyl-propan-2-ol	104-54-1	pev.	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	pev.	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	methyl-methakrylát	80-62-6	kap.	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	chlorbenzen	108-90-7	kap.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	propan-2-ol	67-63-0	kap.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Číslo	Chemické látky ([1])	Číslo CAS	Skup.	Veh. ([2])	EC3 (v %) ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
16	kyselina mléčná	50-21-5	kap.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	methyl-salicylát	119-36-8	kap.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	kyselina salicylová	69-72-7	pev.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Volitelné látky k prokázání lepší funkčnosti oproti metodě LLNA										
19	dodecyl sulfát sodný	151-21-3	pev.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1.5–17.1	+/–	+/–
20	ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kap.	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	xylen	1330-20-7	kap.	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	chlorid nikelnatý	7718-54-9	pev.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Zkratky: AOO = aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1); Číslo CAS = Registrační číslo Chemical Abstracts Service; DMF = *N,N*-dimethylformamid; DMSO = dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlorbenzen; EC3 = odhadovaná koncentrace potřebná k dosažení hodnoty 3 indexu stimulace; HCA = 2-benzylidenoktanal; kap. = kapalina; LLNA = výsledek zkoušky s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin myší (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 429) (2); M = výsledek zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); MEK = ethyl(methyl)keton; NA = nelze použít, neboť index stimulace je menší než 3; NC = nevypočítává se, protože údaje byly získány z jediné studie; pev. = pevná látka; Skup. = skupenství; Veh. = zkušební vehikulum.

(*) Předpokládá se, že nezpůsobuje senzibilizaci u lidí, protože nebyly zjištěny žádné klinické výsledky náplasťového testu, není obsažen v sadě zkoušených náplasťových alergenů a nebyly zjištěny žádné případové zprávy o senzibilizaci u lidí.

(**) Výsledky zkoušek na morčatech nejsou k dispozici.

([1]) Chemické látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

([2]) Vzhledem k tomu, že různá vehikula mohou nepříznivě ovlivňovat funkčnost metody LLNA, by se mělo pro každou srovnávací látku používat doporučené vehikulum (24) (32).

([3]) Průměrná hodnota, pokud byla k dispozici více než jedna hodnota EC3. U látek s negativním výsledkem (tzn. jejichž hodnota indexu stimulace je menší než 3; je uvedena nejvyšší zkoušená koncentrace).

([4]) Počet studií LLNA, ze kterých byly získány příslušné údaje.

([5]) Dostupný na trhu pod názvem Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), což je směs CMI a MI v poměru 3:1. Relativní koncentrace každé složky se pohybují v rozsahu od 1,1 % do 1,25 % (CMI), respektive od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivními složkami jsou hořečnaté soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan měďnatý (0,15 % až 0,17 %), přičemž zbytek je tvořen 74 % až 77 % vody. Přípravek Kathon CG je snadno dostupný od společností Sigma-Aldrich a Rohm & Haas (nyní Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Definované požadavky na spolehlivost a přesnost**

7. Přesnost podobné nebo modifikované metody LLNA by při vyhodnocení za pomoci 18 minimálních srovnávacích látek, které se mají používat, měla být stejná nebo vyšší, než je uvedeno ve standardech funkčnosti metody LLNA. Nová nebo modifikovaná metoda by měla vést ke správnému zatřídění zkoušené látky na základě rozhodnutí typu „ano/ne“. Je však možné, že za použití nové nebo modifikované metody nebudou správně zatříděny všechny minimální srovnávací látky, které by se měly používat. Pokud by byla například chybně zatříděna jedna ze slabě senzibilizujících látek, je možno zvážit zdůvodnění chybného zatřídění a vhodné doplňující údaje (např. výsledky zkoušek, které zajišťují správné zatřídění jiných látek s fyzikálními, chemickými a senzibilizujícími vlastnostmi podobnými vlastnostem chybně zatříděné srovnávací látky) k prokázání odpovídající funkčnosti dotyčné metody. Za takových okolností by se stav validace nové nebo modifikované zkušební metody LLNA posuzoval případ od případu.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

8. Za účelem zjištění vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti by se měla nová nebo modifikovaná metoda LLNA posoudit za použití senzibilizující látky, jejíž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Proto jsou standardy funkčnosti metody LLNA založeny na variabilitě výsledků z opakovaných zkoušek 2-benzylidenoktanalu (HCA). Pro posouzení vnitrolaboratorní spolehlivosti je nutno odvodit hodnoty odhadované prahové koncentrace (ECt) pro HCA při čtyřech různých příležitostech s prodlevou alespoň jednoho týdne mezi jednotlivými zkouškami. Přijatelnou vnitrolaboratorní reprodukovatelnost indikuje schopnost laboratoře získat v každé zkoušce HCA hodnoty ECt v rozmezí od 5 % do 20 %, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty EC3 stanovené pro HCA (10 %) při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

9. Mezilaboratorní reprodukovatelnost nové nebo modifikované metody LLNA by se měla posoudit za použití dvou senzibilizujících látek, jejichž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Standardy funkčnosti metody LLNA jsou založeny na variabilitě výsledků zkoušek HCA a 1-chlor-2,4-dinitrochlorbenzenu (DNCB) v různých laboratořích. Hodnoty ECt by měly být odvozeny nezávisle na základě jedné studie provedené nejméně ve třech různých laboratořích. Aby byla prokázána přijatelná mezilaboratorní reprodukovatelnost, měla by každá laboratoř získat hodnoty ECt v rozsahu od 5 % do 20 % pro HCA a v rozsahu od 0,025 % do 0,1 % pro DNCB, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty koncentrací EC3 stanovené pro HCA (10 %) a DNCB (0,05 %), při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

▼M3

Dodatek 2

Definice

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (14).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Odhadovaná prahová koncentrace (ECt): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebná pro dosažení takové hodnoty indexu stimulace, která svědčí o pozitivní odezvě.

Odhadovaná koncentrace tři (EC3): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebné pro dosažení hodnoty tři indexu stimulace.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (14).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu.

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro zkušební metodu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Taková zkušební metoda by byla kandidátem pro dodatečnou validaci. Používá se namísto podobné zkušební metody (14).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je funkčně a mechanicky podobná. Patří mezi ně i) zásadní složky zkušební metody, i) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (14).

Chráněná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž je výroba a distribuce omezena patenty, autorskými právy, ochrannými známkami apod.

▼**M3**

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Srovnávací látky: Chemické látky zvolené k použití při procesu validace, pro něž jsou již známy odezvy v rámci zkušebního systému *in vitro* nebo *in vivo* nebo odezvy u biologického druhu, který je předmětem zájmu daného zkoumání. Tyto chemické látky by měly být reprezentativními zástupci tříd chemických látek, u nichž se předpokládá používání dotyčné zkušební metody, a měly by představovat celou škálu reakcí, jež lze očekávat u chemických látek, pro něž se může zkušební metoda používat, od silné přes slabou až po negativní odezvu. Pro jednotlivé fáze procesu validace a pro různé zkušební metody a různá použití zkoušek mohou být potřebné rozdílné sady srovnávacích látek (14).

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (14).

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (14).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (14).

▼B

B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 424 (1997).

Tato zkušební metoda byla navržena za účelem získání informací, které jsou nezbytné ke schválení nebo k další charakterizaci potenciální neurotoxicity chemických látek u dospělých zvířat. Tuto metodu lze buď kombinovat s již existujícími zkušebními metodami pro studium toxicity po opakovaných dávkách, nebo ji lze provést jako samostatnou zkoušku. Pro usnadnění plánování studií založených na této zkušební metodě se doporučuje prostudovat Doporučení OECD o strategiích a metodách zkoušení neurotoxicity (Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1). To je zvláště důležité tehdy, je-li třeba zvážit změnu sledování a zkušebních postupů, jak jsou doporučeny pro rutinní používání této metody. Doporučení byla připravena pro usnadnění výběru zkušebních postupů pro specifické podmínky použití.

Posouzení vývojové neurotoxicity není předmětem této metody.

1.1 ÚVOD

Při posuzování a vyhodnocování toxických vlastností chemických látek je velmi důležité zvážit potenciál neurotoxických účinků. Již metoda zkoušení systémové toxicity po opakovaných dávkách zahrnuje sledování, která mají odkrýt potenciální neurotoxicitu. Tuto zkušební metodu lze používat při plánování studie za účelem získání dalších informací o neurotoxických účincích zjištěných při studii systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo pro jejich potvrzení. Z úvah o potenciální neurotoxicitě určitých druhů chemických látek však může vyplynout, že by mohly být vhodněji posouzeny pomocí této metody, pokud neexistují údaje o potenciální neurotoxicitě ze studií systémové toxicity po opakovaných dávkách. Tyto úvahy zahrnují například:

— pozorování neurologických příznaků nebo neuropatologických lézí v jiných studiích toxicity než studiích systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo

— strukturní podobnost nebo jiné informace, které posuzovanou látku spojují se známými neurotoxickými látkami.

Kromě toho mohou existovat i další případy, kdy je použití této metody vhodné; další podrobnosti jsou uvedeny v literatuře (1).

Tato metoda byla navržena tak, aby ji bylo možné přizpůsobit zvláštním potřebám při potvrzování specifické histopatologické a behaviorální neurotoxicity chemických látek a při charakterizaci a kvantifikaci neurotoxických účinků.

▼B

Dříve se za neurotoxicitu považovaly neuropatie zahrnující neuropatologické léze nebo neurologické dysfunkce, jako např. záchvaty, ochrnutí nebo třes. I když jsou neuropatie významným projevem neurotoxicity, dnes je již jasné, že existují mnohé další příznaky toxicity pro nervový systém (např. ztráta motorické koordinace, senzorické výpadky, poruchy učení a paměti), které se nemusí projevovat ani neuropatií, ani v jiných typech zkoušek.

Tato metoda zkoušení neurotoxicity je navržena tak, aby odhalovala závažné neurobehaviorální a neuropatologické účinky na dospělé hlodavce. Zatímco behaviorální účinky i při nepřítomnosti morfologických změn mohou odrážet nepříznivý vliv na organismus, neznamená to, že všechny behaviorální změny jsou specifické pro nervový systém. Z tohoto důvodu by se měly jakékoliv zjištěné změny vyhodnotit v souvislosti s histopatologickými, hematologickými nebo biochemickými údaji, jakož i s údaji o ostatních typech systémové nervové toxicity. Zkoušení požadované v této metodě za účelem charakterizace a kvantifikace neurotoxických odpovědí zahrnuje specifické histopatologické a behaviorální postupy, které lze navíc podpořit elektrofyziologickým a/nebo biochemickým vyšetřením (1, 2, 3, 4).

Neurotoxické látky mohou působit na množství cílových struktur v rámci nervového systému a prostřednictvím různých mechanismů. Protože neexistuje jediná sada zkoušek pro posouzení neurotoxického potenciálu u všech látek, může být nezbytné využít dalších zkoušek *in vivo* nebo *in vitro*, které jsou specifické pro typ pozorované nebo očekávané neurotoxicity.

Tuto zkušební metodu lze použít také společně s doporučeními OECD o strategiích a metodách testování neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1) při plánování zkoušek určených k další charakterizaci nebo zvýšení citlivosti kvantifikace vztahu dávka-odezva s cílem lépe odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky, anebo potvrdit známá nebo očekávaná rizika chemických látek. Lze například navrhnout zkoušky, které by identifikovaly a zhodnotily neurotoxický mechanismus (neurotoxické mechanismy) nebo doplnily údaje, které již byly získány základními neurobehaviorálními a neuropatologickými vyšetřovacími postupy. Takové studie nemusí replikovat údaje použitím standardních postupů doporučených v této metodě, jsou-li takové údaje již k dispozici a nepovažují se za nezbytné k interpretaci výsledků z této studie.

Používá-li se tato zkouška neurotoxicity samotná nebo v kombinaci, poskytuje informace, které mohou:

— určit, zda zkoušené chemické látky ovlivňují nervový systém trvale, nebo vratně,

— přispět k charakterizaci změn nervového systému spojených s expozicí chemické látce a přispět k pochopení mechanismů účinku,

▼B

— stanovit vztahy mezi dávkou a odezvou a časem a odezvou s cílem odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky (NOAEL) (kterou lze použít pro vytvoření bezpečnostních kritérií pro chemickou látku).

Tato zkušební metoda používá orální aplikaci zkušební látky. Jiné typy aplikace (např. kožní nebo inhalační) mohou být vhodnější a mohou si také vyžádat modifikaci doporučovaných postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích.

1.2 DEFINICE

Nepříznivý účinek: jakákoliv změna spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo přizpůsobit prostředí.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky (v gramech nebo miligramech) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm nebo v miligramech na kilogram potravy).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

Neurotoxicita: nepříznivá změna struktury nebo funkce nervového systému, která je výsledkem expozice chemickému, biologickému nebo fyzikálnímu činiteli.

Neurotoxické agens: jakýkoliv chemický, biologický nebo fyzikální činitel, který má neurotoxický potenciál.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená chemická látka se podává orálně v různých dávkách několika skupinám laboratorních hlodavců. Obvykle se vyžaduje podávání opakovaných dávek a dávkovací režim může být buď 28denní, nebo subchronický (90 dnů), nebo chronický (1 rok nebo déle). Postupy stanovené v této zkušební metodě lze použít i při studii akutní neurotoxicity. Zvířata jsou testována za účelem zjištění nebo charakterizace behaviorálních a/nebo neurologických odchylek. Během každého pozorovacího období se hodnotí řada znaků chování, které by mohly být ovlivněny neurotoxickými látkami. Na konci zkoušky se u podskupiny zvířat obou pohlaví z každé skupiny provede perfuze *in situ* a připraví se a vyšetří řezy mozku, míchy a periferních nervů.

Pokud se zkouška provádí jako samostatná zkouška pro vyšetření neurotoxicity nebo charakterizaci neurotoxických účinků, lze zvířata z každé skupiny, která nebyla použita k perfuzi a k následnému histopatologickému vyšetření (viz tabulka 1), použít ke specifickým neurobehaviorálním, neuropatologickými, neurochemickým nebo elektrofyziologickým vyšetřením, která mohou doplnit údaje získané ze standardních vyšetření vyžadovaných v této metodě (1). Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, jestliže empirická pozorování nebo předpokládané účinky naznačují specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity chemické látky. Zbývající zvířata lze případně použít k některým jiným hodnocením, jako jsou např. hodnocení požadovaná ve zkušebních metodách u studií toxicity po opakovaných dávkách na hlodavcích.

▼B

Pokud se postupy této zkušební metody kombinují s postupy jiných zkušebních metod, je nezbytný dostatečný počet zvířat, aby byly splněny požadavky pro pozorování v obou studiích.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr živočišných druhů**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, s odpovídajícím zdůvodnění lze použít i jiné druhy hlodavců. Mělo by se jednat o běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení, nejlépe když zvířata dosáhnou stáří šesti týdnů a v každém případě dříve, než dosáhnou stáří devíti týdnů. Pokud se však tato zkouška kombinuje s dalšími zkouškami, je možné, že požadavky týkající se stáří zvířat budou vyžadovat určité změny. Na začátku studie by měl být u používaných zvířat jen minimální rozptyl hmotnosti a neměl by překročit 20 % průměrné hmotnosti u jednotlivých pohlaví. Pokud se před dlouhodobou studií provádí orientační krátkodobá studie toxicity po opakovaných dávkách, je třeba u obou studií použít pokusná zvířata ze stejných kmenů a stejného zdroje.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení bude umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Na výběr stravy může mít vliv nutnost zajistit vhodnou přísadu pro zkoušenou látku, je-li látka podávána touto metodou. Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je lze umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví.

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zdravá mladá zvířata jsou náhodně rozdělena do experimentálních a kontrolních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

1.4.4 **Způsob aplikace a příprava dávek**

V této zkušební metodě se jedná konkrétně o orální způsob aplikace zkoušené látky. Orální aplikaci lze provádět prostřednictvím žaludeční sondy, potravy, pitné vody nebo tobolek. Použít lze i jiné způsoby aplikace (např. kožní nebo inhalační), které si mohou vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích. Je třeba uvést důvody pro výběr způsobu aplikace a odpovídající modifikace postupů v rámci této zkušební metody.

▼B

Zkoušená látka se podle potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku/suspenze v jiném vehikulu. Je třeba znát toxické vlastnosti vehikula. Kromě toho je třeba věnovat pozornost následujícím typickým znakům vehikula: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky a dále účinku na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinku na spotřebu potravy nebo vody anebo nutriční stav zvířat.

1.5 POSTUPY

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Pokud se studie provádí jako samostatná studie, je třeba použít v každé dávkové a kontrolní skupině alespoň 20 zvířat (10 samic a 10 samců) pro vyhodnocení podrobných klinických a funkčních pozorování. Alespoň u pěti samců a pěti samic vybraných z těchto deseti samců a samic je třeba na konci zkoušky provést perfúzi *in situ* a použít je k podrobnému neurohistopatologickému vyšetření.V případě, kdy jsou v dané dávkové skupině pozorovány příznaky neurotoxických účinků pouze u omezeného počtu zvířat, je třeba zvážit přiřazení těchto zvířat ke zvířatům vybraným pro perfúzi. Pokud se studie provádí v kombinaci se studií toxicity po opakovaných dávkách, je třeba použít odpovídající počet zvířat, aby bylo možné splnit cíle obou studií. Minimální počet zvířat na skupinu u nejrůznějších kombinací studií je uveden v tabulce 1. Pokud se plánuje utracení ve vložených intervalech nebo vytvoření reparační skupiny ke sledování vratných účinků, perzistence nebo zpožděného výskytu toxických účinků po skončení aplikace, nebo se zvažují dodatečná sledování, je třeba zvýšit počet zvířat, aby se zajistil dostatečný počet zvířat požadovaných ke sledování a k histopatologickému vyšetření.

1.5.2 **Experimentální a kontrolní skupina**

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina; pokud se však podle jiných údajů neočekávají žádné účinky po opakovaných dávkách 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může být provedena limitní zkouška. Nejsou-li k dispozici žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozpětí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu.

1.5.3 **Kontrola spolehlivosti**

Laboratoř provádějící zkoušku by měla předložit údaje prokazující její způsobilost pro uskutečnění zkoušky a citlivost používaných postupů. Takové údaje by měly poskytnout důkaz o schopnosti odhalit a popřípadě kvantifikovat změny v různých ukazatelích doporučených ke sledování, jako jsou např. vegetativní příznaky, reaktivita na smyslové podněty, síla úchopu a motorická aktivita. Informace o chemických látkách, které způsobují různé typy neurotoxických reakcí a které jsou vhodné jako pozitivní kontrolní látky, lze nalézt v literatuře (2 až 9). Historické údaje lze použít tehdy, pokud zůstanou stejné základní aspekty experimentálních postupů. Doporučuje se pravidelná aktualizace historických údajů. Nové kontrolní údaje by měly být doplněny tehdy, pokud provádějící laboratoř v průběhu zkoušky změní některý základní prvek provádění zkoušky nebo postupu.

▼B

1.5.4 **Výběr dávky**

Úrovně dávek je třeba vybrat s ohledem na předchozí zjištěnou toxicitu a kinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo podobné látky. Nejvyšší úroveň dávky se zvolí tak, aby vyvolala neurotoxické nebo jasné systémové toxické účinky, aby bylo možné prokázat závislost odpovědi na dávkách a úroveň dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL), zvolí se sestupná posloupnost úrovní dávek. V zásadě je třeba stanovit úrovně dávek tak, aby bylo možné odlišit primární toxické účinky na nervový systém od systémové toxicity. Obvykle jsou optimální dva až tři intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). Rovněž je třeba vzít v úvahu i odhad úrovně expozice u člověka, je-li k dispozici.

1.5.5 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné neurotoxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není nezbytné provádět kompletní studii za použití tří úrovní dávek. V některých případech předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky. Při provedení orální akutní zkoušky by dávka pro limitní zkoušku měla činit alespoň 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka se podává zvířatům denně, 7 dnů v týdnu, po dobu alespoň 28 dnů. Použití 5denního dávkovacího režimu nebo kratší expozice je třeba zdůvodnit. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se podávat v jedné dávce pomocí sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti. V případě vodných roztoků je však možné zvážit i použití až 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých látek, které při vyšších koncentracích obvykle vyvolají silnější účinky, by se měly změny množství zkoušené látky minimalizovat upravením koncentrace, aby se na všech úrovních dávek zajistilo konstantní množství.

U látek podávaných prostřednictvím potravy nebo pitné vody je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivnilo vyváženost běžné potravy nebo příjmu vody. Je-li zkoušená látka podávána v potravě, je třeba používat buď konstantní koncentraci v potravě (v ppm), nebo konstantní úrovně dávky, pokud jde o tělesnou hmotnost zvířete. Použití jiné alternativy je třeba zdůvodnit. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Provádí-li se studie s opakovanou dávkou jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by být v obou studiích používána stejná potrava. Nelze-li v případě studie akutní toxicity použít jednotlivou dávku, je možné podávat dávku po menších částech po dobu, která nepřekročí 24 hodin.

▼B

1.6 POZOROVÁNÍ

1.6.1 **Četnost pozorování a zkoušek**

U studií s opakovanou dávkou by doba pozorování měla pokrýt celé dávkovací období. U studií akutní toxicity pokračuje pozorování ještě 14 dnů po skončení aplikace. U zvířat v satelitních skupinách, která jsou v období po skončení aplikace chována bez expozice, by pozorování mělo zahrnovat i toto období.

Pozorování je třeba provádět dostatečně často, aby se maximalizovala pravděpodobnost odhalení všech behaviorálních a/nebo neurologických anomálií. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Četnost klinických pozorování a funkčních zkoušek je shrnuta v tabulce 2. Pokud kinetické nebo jiné údaje získané z předchozích studií naznačují potřebu zvolit časové body pozorování nebo zkoušek nebo období po skončení pozorování, je nutné zvolit takový náhradní plán, na jehož základě lze získat co nejvíce informací. Změny plánu je třeba zdůvodnit.

1.6.1.1 *Pozorování celkového zdravotního stavu a úmrtnosti/nemocnosti*

U všech zvířat se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav a nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění nemocnosti a úmrtnosti.

1.6.1.2 *Podrobná klinická pozorování*

Podrobná klinická pozorování se provedou u všech zvířat vybraných k těmto účelům (viz tabulka 1) nejprve před první expozicí (aby bylo možné intraindividuální srovnání) a poté v různých intervalech podle trvání studie (viz tabulka 2). Podrobná klinická pozorování u satelitních zotavovacích skupin se provedou na konci zotavovacího období. Podrobná klinická pozorování se provádějí mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru. Pozorování se pečlivě zaznamenají pomocí systémů hodnocení, které zahrnují kritéria nebo bodovací stupnice pro jednotlivá měření v rámci pozorování. Používaná kritéria nebo stupnice musí být explicitně definovány zkušební laboratoří. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší (a nesouvisely systematicky s aplikací) a aby vyšetření prováděly osoby, které nejsou informovány o skupině, do které zvíře patří.

Doporučuje se provádět pozorování strukturovaně, přičemž se u každého zvířete při každém pozorování systematicky používají jasně definovaná kritéria (včetně definice normálního „rozpětí“). „Normální rozpětí“ je třeba dostatečně zdokumentovat. Všechny pozorované příznaky se zaznamenají. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost pozorovaných příznaků. Klinická pozorování zahrnují kromě jiného změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a autonomních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace a zbarvení moči).

▼B

Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního pozorovacího prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí nebo třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

1.6.1.3 *Funkční zkoušky*

Podobně jako podrobná klinická pozorování se u jednotlivých zvířat vybraných k těmto účelům provedou i funkční zkoušky – nejprve před expozicí a potom vícekrát po jejím provedení (viz tabulka 1). Četnost funkčního testování závisí rovněž na trvání studie (viz tabulka 2). Mimo dobu pozorování stanovenou v tabulce 2 se provede také funkční pozorování satelitní zotavovací skupiny, a to těsně před plánovaným usmrcením. Funkční zkoušky zahrnují reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty (5, 6, 7)), změří se síla úchopu končetiny (8) a motorická aktivita (9). Motorická aktivita se měří pomocí automatického přístroje schopného odhalit jak snížení, tak i zvýšení této aktivity. Pokud se použije jiný systém, měl by být kvantitativní a je třeba prokázat jeho citlivost a spolehlivost. Každý přístroj je nutné otestovat, aby se zajistila jeho spolehlivost po celé časové období a homogenita s ostatními přístroji. Další podrobnosti o postupech, kterými se lze řídit, jsou uvedeny v příslušných odkazech. Pokud neexistují žádné údaje (např. údaje o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, epidemiologické údaje, jiné toxikologické studie), které by ukazovaly na potenciální neurotoxické účinky, je nutné za účelem podrobnějšího vyšetření těchto možných účinků zvážit začlenění specializovanějších zkoušek smyslových a motorických funkcí nebo učení a paměti. Další informace o specializovanějších zkouškách a jejich používání je uvedeno v literatuře (1).

Ve výjimečných případech lze zvířata vykazující známky toxicity v takové míře, která by významně narušila provedení funkční zkoušky, z této zkoušky vyřadit. Vyřazení těchto zvířat z funkčních zkoušek je nutné zdůvodnit.

1.6.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody**

U studií s délkou trvání do 90 dnů se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně a každý týden se rovněž provádí měření spotřeby potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média). U dlouhodobých studií se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou za 4 týdny. Během prvních 13 týdnů se měří spotřeba potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média) a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud si změny zdravotního stavu nebo změny tělesné hmotnosti nevyžádají jiný interval.

▼B

1.6.3 **Oftalmologické vyšetření**

U studií delších než 28 dnů se před aplikací zkoušené látky a před ukončením studie provede oftalmologické vyšetření pomocí oftalmoskopu nebo jiného vhodného nástroje, a to nejlépe u všech zvířat, alespoň však u všech zvířat ze skupin s vysokou dávkou a z kontrolních skupin. Pokud se zjistí změny na očích nebo pokud klinické příznaky ukazují na nutnost vyšetření očí, vyšetří se všechna zvířata. U dlouhodobých studií se oftalmologické vyšetření provede ve 13. týdnu stáří zvířat. Oftalmologická vyšetření není nutné provádět tehdy, jsou-li již k dispozici údaje z jiných podobně dlouhých studií s podobnými úrovněmi dávek.

1.6.4 **Hematologické a biochemické vyšetření**

Pokud se studie neurotoxicity provádí v kombinaci se studií systémové toxicity po opakovaných dávkách, provede se hematologické vyšetření a stanovení klinických biochemických parametrů tak, jak je uvedeno v příslušné metodě studie systémové toxicity. Odebírání vzorků se provede tak, aby se minimalizovaly jakékoliv účinky na chování.

1.6.5 **Histopatologie**

Neuropatologické vyšetření se navrhne tak, aby doplnilo a rozšířilo pozorování provedená v rámci této studie během fáze *in vivo*. Tkáně alespoň pěti zvířat každého pohlaví z každé skupiny (viz tabulka 1 a další odstavec) se fixují *in situ* za použití obecně uznávaných perfuzních a fixačních technik (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Zaznamenají se jakékoliv výrazné změny. Pokud se studie provádí jako samostatná studie neurotoxicity nebo studie charakterizující neurotoxické účinky, lze použít zbytek zvířat buď ke specifickým neurobehaviorálním (10, 11), neuropatologickým (10, 11, 12, 13), neurochemickým (10, 11, 14, 15), nebo elektrofyziologickým (10, 11, 16, 17) postupům, které mohou doplnit zde popsané postupy a vyšetření, anebo zvýšit počet subjektů vyšetřovaných k histopatologickým účelům. Tyto doplňkové postupy jsou zvláště užitečné tehdy, pokud empirická pozorování nebo očekávané účinky ukazují na specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity (2, 3). Je také možné zbytek zvířat použít k běžným patologickým hodnocením, která jsou popsána v metodě studií po opakovaných dávkách.

U všech tkáňových vzorků zalitých parafínem se provede běžný postup barvení, např. pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E), a mikroskopické vyšetření. Jsou-li pozorovány nebo existuje-li podezření na příznaky periferní neuropatie, vyšetří se vzorky periferních nervů zalitých do pryskyřic (vosků). Klinické příznaky mohou rovněž poukázat na další místa, která je nutné vyšetřit, nebo na nutnost použít speciální postupy barvení. Pokyny k určení dalších míst, která je třeba vyšetřit, lze nalézt v literatuře (3, 4). K prokázání charakteristických typů patologické změny může přispět i odpovídající speciální barvení (18).

▼B

U reprezentativních řezů centrálního a periferního nervového systému se provede histologické vyšetření (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Mezi vyšetřované oblasti obvykle patří: přední mozek, střední část mozku, včetně řezu hippocampem, střední mozek, mozeček, Varolův most, prodloužená mícha, oko se zrakovým nervem a sítnicí, mícha v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorsální kořenová ganglia, dorsální a ventrální kořenová vlákna, proximální část *n. ischiadicus* a proximální část *n. tibialis* (v oblasti kolena) a *n. tibialis* z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy. Pozornost je nutné věnovat uspořádání cév v oblasti nervového systému. Rovněž se vyšetří vzorky z kosterního svalstva, a to zvláště z lýtkového svalu. Zvláštní pozornost je nutné věnovat místům s buněčnou a vláknitou strukturou a těm strukturám v oblasti CNS a PNS, o nichž je známo, že na ně mají neurotoxické látky značný vliv.

Informace o neuropatologických změnách, které typicky vznikají v důsledku expozice toxickým látkám, lze nalézt v literatuře (3, 4). Doporučuje se postupné vyšetření tkáňových vzorků, při kterém se porovnají nejprve vzorky řezů ze skupiny s vysokou dávkou se vzorky řezů z kontrolní skupiny. Nejsou-li ve vzorcích z těchto skupin zjištěny žádné neuropatologické změny, není nutné provádět další analýzu. Jsou-li zjištěny ve skupině s vysokou dávkou neuropatologické změny, je třeba následně okódovat a vyšetřit vzorky ze všech potenciálně zasažených tkání ze skupin se střední a nízkou dávkou.

Pokud je během kvalitativního vyšetření zjištěna přítomnost neuropatologických změn, provede se druhé vyšetření všech oblastí nervového systému, které vykazují tyto změny. Okódují se řezy ze všech dávkových skupin ze všech potenciálně zasažených oblastí a vyšetří v náhodném pořadí bez znalosti kódu. Zaznamená se četnost a závažnost všech lézí. Po zhodnocení všech oblastí ze všech dávkových skupin se kód odkryje a provede se statistická analýza za účelem vyhodnocení vztahu dávka-odezva. U každé léze se popíší příklady různých stupňů závažnosti.

Neuropatologické výsledky se vyhodnotí v souvislosti s pozorováním a měřením chování a rovněž spolu s dalšími údaji z předchozích a souběžných studií systémové toxicity zkoušené látky.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se jednotlivá data, která se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou experimentální nebo kontrolní skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo počet zvířat usmrcených z humánních důvodů a doba uhynutí nebo humánního usmrcení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání, typu a závažnosti jakýchkoliv příznaků toxicity, počet zvířat vykazujících léze, včetně typu a závažnosti léze (lézí).

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky studie je třeba vyhodnotit z hlediska výskytu, závažnosti a korelace neurobehaviorálních a neuropatologických účinků (rovněž i neurochemických nebo elektrofyziologických účinků, jsou-li provedena doplňující vyšetření) a z hlediska dalších zjištěných nepříznivých účinků. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnými a obecně uznávanými statistickými metodami. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální vlastnosti (včetně isomerie, čistoty a fyzikálně-chemických vlastností),

— identifikační údaje.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, aklimatizace, potrava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o úpravě směsi zkoušené látky či přípravě potravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění výběru úrovní dávky,

— zdůvodnění způsobu aplikace a trvání expozice,

— přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě nebo pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti,

— podrobnosti o potravě a kvalitě vody.

Pozorovací a zkušební postupy:

— podrobnosti o přiřazení zvířat z jednotlivých skupin do podskupin s perfuzí,

— podrobnosti o systémech hodnocení, včetně kritérií a hodnotících stupnic pro jednotlivá měření v rámci podrobných klinických pozorování,

▼B

— podrobnosti o funkčních zkouškách pro měření reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a hmatové), pro měření síly úchopu končetiny, motorické aktivity (včetně podrobností o automatických zařízeních pro zjišťování aktivity) a další použité postupy,

— podrobnosti o oftalmologických vyšetřeních, hematologických a klinických biochemických zkouškách s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,

— podrobnosti o specifických neurobehaviorálních, neuropatologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech.

Výsledky:

— tělesná hmotnost a její změny, včetně tělesné hmotnosti v době usmrcení,

— spotřeba potravy a případně vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávek, včetně popisu příznaků toxicity nebo úmrtnosti,

— povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických nálezů (zda jsou vratné nebo nevratné),

— podrobný popis všech výsledků funkčních testů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech neurobehaviorálních, neuropatologických a neurochemických nebo elektrofyziologických výsledků, jsou-li k dispozici,

— údaje o absorpci a metabolismu, jsou-li k dispozici,

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Diskuse o výsledcích:

— informace o závislosti účinku na dávce,

— význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky,

— dávková úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL).

Závěry:

— je žádoucí uvést konkrétní vyjádření o celkové neurotoxicitě zkoušené chemické látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. Návrh.

2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Návrh.

3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233–236.

9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368–378.

16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, s. 299–335.

17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, s. 726–742.

18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabulka 1

Minimální počet zvířat na skupinu, provádí-li se studie neurotoxicity samostatně nebo v kombinaci s dalšími studiemi

	TYP PROVEDENÉ STUDIE NEUROTOXICITY			
	Samostatná studie	Kombinovaná studie s 28denní studií	Kombinovaná studie s 90denní studií	Kombinovaná studie se studií chronické toxicity
Počet zvířat na skupinu	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	15 samců a 15 samic	25 samců a 25 samic
Počet zvířat vybraných k funkčnímu testování, včetně podrobných klinických pozorování	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic
Počet zvířat vybraných k perfuzi *in situ* a neurohistopatologickému vyšetření	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic
Počet zvířat vybraných k pozorování toxicity po opakované dávce subchronické/chronické, k hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, k histopatologickému vyšetření atd., jak je uvedeno v příslušných doporučeních		5 samců a 5 samic	10 samců ([1]) a 10 samic ([1])	20 samců ([1]) a 20 samic ([1])
Případná doplňující pozorování	5 samců a 5 samic			

([1]) Zahrnuto je pět zvířat vybraných k funkčnímu testování a podrobnému klinickému pozorování jako součást studie neurotoxicity.

▼B

Tabulka 2

Četnost klinických pozorování a funkčních testů

Typ pozorování		Délka studie			
		akutní	28denní	90denní	chronická
U všech zvířat	Celkový zdravotní stav	Denně	Denně	Denně	Denně
	Mortalita/morbidita	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně
U všech zvířat vybraných k funkčním pozorováním	Podrobná klinická pozorování	— před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování	— před první expozicí — poté jednou týdně	— před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně	— před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce
	Funkční testy	— před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování	— před první expozicí — během čtvrtého týdne aplikace co nejblíže ke konci období expozice	— před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně	— před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce

▼B

B.44 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*

1. METODA

Tato zkušební metoda je ekvivalentní testu OECD TG 427 (2004).

1.1 ÚVOD

Expozice mnohým chemickým látkám se děje hlavně cestou přes kůži, zatímco většina toxikologických studií provedených na pokusných zvířatech užívá perorální podání. Perkutánní absorpční studie *in vivo* stanovená tímto návodem skýtá propojení nezbytné pro extrapolaci z perorálních studií na posouzení bezpečnosti po expozicích dermálních.

Látka musí proniknout velkým počtem buněčných vrstev kůže, než se může dostat do krevního oběhu. Vrstvou určující rychlost je pro většinu látek *stratum corneum* (zrohovatělá vrstva) složená z mrtvých buněk. Permeabilita (propustnost) skrz kůži závisí na lipofilitě chemické látky a na tloušťce vnější vrstvy epidermis a také na faktorech, jako je např. molární hmotnost a koncentrace dané látky. Obecně je vrstva kůže potkanů a králíků permeabilnější než kůže lidská, zatímco kůže morčat a opic se kůži lidské podobají více.

Metody měření perkutánní absorpce se dělí do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* jsou schopny skýtat dobré informace o absorpci kůží s různými druhy pokusných zvířat. Nedávno byly vyvinuty *in vitro* metody. Ty využívají transport přes plnou či částečnou tloušťku kůže zvířecí či lidské do rezervoáru tekutiny. Metody *in vitro* jsou popsány ve zvláštní metodě zkoušení (1). Doporučuje se brát v úvahu dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) na pomoc při výběru nejvhodnější metody pro danou situaci, neboť popisuje podrobněji vhodnost metod *in vivo* a *in vitro*.

Metoda *in vivo* zde popsaná umožňuje stanovení průniku zkoušené látky kůží do systémových kompartmentů. Tento postup je široce používán mnoho let (3, 4, 5, 6, 7). Ačkoli perkutánní absorpční studie *in vitro* mohou být vhodné v mnoha případech, mohou nastat situace, kdy lze získat potřebné údaje pouze studií provedenou *in vivo*.

Výhodou *in vivo* metody je, že využívá fyziologicky a metabolicky intaktní systém, využívá druhy společné mnoha studiím toxicity a může být modifikována pro použití s jinými druhy. Nevýhodou je využívání živých zvířat, potřeba radioznačených materiálů k usnadnění spolehlivých výsledků, potíže se stanovením časné fáze absorpce a rozdíly v permeabilitě kůže preferovaného druhu (potkan) a kůže lidské. Zvířecí kůže je obecně permeabilnější, a proto může být perkutánní absorpce u člověka nadhodnocena (6, 8, 9). Leptavé/žíravé látky by na živých zvířatech zkoušeny být neměly.

▼B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavírajícím krytu, včetně množství prokazatelně odtěkaného z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vivo*): množství v moči, ve zbytcích v kleci, ve výkalech, ve vydechovaném vzduchu (je-li měřeno), v krvi, v tkáních (jsou-li sbírány) a ve zbývajících částech mrtvých těl po odstranění kůže z místa aplikace.

Absorbovatelná dávka: množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, nejlépe radioaktivně značená, se aplikuje na zvířecí kůži zbavenou srsti na jedné nebo více vhodných úrovních dávky ve formě reprezentativní pro užívání přípravku. Zkoušený přípravek se ponechá ve styku s kůží po předem určenou dobu pod vhodným krytem (neokluzivním, semiokluzivním či okluzivním), aby nedošlo k požití zkušebního přípravku. Po uplynutí doby expozice se kryt odstraní a kůže se očistí vhodným čisticím činidlem, kryt a čisticí materiály se uchovají pro analýzu a aplikuje se nový kryt. Zvířata jsou držena před expozicí, během ní a po ní v jednotlivých metabolických klecích a jejich exkrementy a vydechovaný vzduch během uvedených období se sbírají pro analýzy. Od sběru vydechovaného vzduchu lze upustit, jsou-li známy dostatečné údaje o tom, že se tvoří jen málo radioaktivních těkavých metabolitů nebo že se netvoří žádné. Každá studie bude obvykle zahrnovat několik skupin zvířat, která budou exponována zkoušenému přípravku. Jedna skupina zvířat bude usmrcena na konci doby expozice. Ostatní skupiny zvířat budou usmrcovány v naplánovaných časových intervalech poté (2). Po uplynutí vzorkovacího období se usmrtí zbývající zvířata, krev se odebere k analýze, místo aplikace se odebere k analýze a těla se analyzují vzhledem k nevyměšenému materiálu. Vzorky se analyzují vhodnými prostředky a odhadne se míra perkutánní absorpce (6, 8, 9).

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Nejběžnějším používaným druhem je potkan, ale lze používat rovněž kmeny bez srsti a druhy s rychlostí absorpce kůží podobnější lidským (3, 6, 7, 8, 9). Používána by měla být mladá dospělá zdravá zvířata stejného pohlaví (automaticky voleným pohlavím jsou samci) běžně využívaných pokusných kmenů. Na počátku studie by hmotnostní váhové odchylky zvířat váhy neměly přesáhnout ± 20 % střední hmotnosti. Například jsou vhodní samci potkanů o hmotnosti 200–250 g, zvláště v horní polovině uvedeného rozsahu.

▼B

1.4.2 **Počet a pohlaví zvířat**

Pro každý zkoušený přípravek a každý stanovený konečný čas by měla být použita skupina nejméně čtyř zvířat stejného pohlaví. Každá skupina zvířat bude usmrcena po různých časových intervalech, např. na konci expoziční doby (obvykle 6 nebo 24 hodin) a v následných intervalech (např. 48 a 72 hodin). Pokud dostupné údaje prokazují podstatný rozdíl v dermální toxicitě u samců a samic, mělo by být vybráno citlivější pohlaví. Nejsou-li takové údaje dostupné, lze použít obě pohlaví.

1.4.3 **Podmínky útulku a krmení**

Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22 °C (± 3 °C). Ačkoli relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a přednostně by neměla přesáhnout 70 %, kromě doby čištění místností, žádoucí vlhkost je 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení může být použita konvenční laboratorní potrava, měla by být volně dostupná spolu s neomezovaným zdrojem pitné vody. Během studie a přednostně rovněž během aklimatizace jsou zvířata držena jednotlivě v metabolických klecích. Protože rozsypaná potrava a rozlitá voda může ohrozit výsledky, měla by být pravděpodobnost takových událostí minimalizována.

1.4.4 **Příprava zvířat**

Zvířata jsou označena způsobem umožňujícím jejich individuální identifikaci a držena v jejich klecích nejméně pět dnů před zahájením studie, aby se aklimatizovala na laboratorní podmínky.

Po aklimatizačním období a přibližně 24 hodin před aplikací dávek je každé zvíře zbaveno srsti na kůži v oblasti plece a zad. Permeabilita poškozené a nepoškození kůže se liší a mělo by se předcházet jejímu odření. Po odstranění srsti a přibližně 24 hodin před aplikací zkoušené látky na kůži (viz bod 1.4.7) by kůže měla být zbavena kožního tuku omytím acetonem. Nedoporučuje se další omytí mýdlem a vodou, protože zbytky mýdla by mohly podpořit absorpci zkoušené látky kůží. Dotyčná oblast musí být dostatečně velká, přednostně nejméně 10 cm^2, aby bylo možno spolehlivě vypočítat absorbované množství zkoušené chemické látky na cm^2. Takto velkou plocha mají potkani o tělesné hmotnosti 200–250 g. Po přípravě jsou zvířata vrácena do metabolických klecí.

1.4.5 **Zkoušená látka**

Zkoušená látka je entita, jejíž penetrační vlastnosti mají být zjištěny. V ideálním případě by zkoušená látka měla být radioaktivně značena.

1.4.6 **Zkoušený přípravek**

Zkoušený látkový přípravek (např. čistý, zředěný, nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku, která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponovány (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna. Je-li to nutné, je zkoušená látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Pro jiné vehikulum než voda by měly být známy charakteristiky jeho absorpce a potenciální interakce se zkoušenou látkou.

▼B

1.4.7 **Aplikace na kůži**

Na povrchu kůže je definováno místo aplikace se specifickou velikosti povrchu. Na toto místo je rovnoměrně naneseno známé množství zkoušeného přípravku. Toto množství by normálně mělo imitovat potenciální expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm^2 pro tuhé látky a až 10 µl/cm^{2}pro kapaliny. Jiná množství by měla být zdůvodněna předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Po aplikaci musí být aplikační místo chráněno před setřením. Příklad obvyklého opatření je na obrázku 1. Obvykle je aplikační místo chráněno neuzavřeným krytem (např. překrytím permeabilní nylonovou gázou). Avšak pro neurčité aplikace by aplikační místo mělo být uzavřeno. V případě, že vypařování polotěkavých zkoušených látek snižuje podíl znovuzachycené zkoušené látky až na nepřijatelný rozsah (viz též bod 1.4.10, první odstavec), je nutné zachycovat vypařovanou látku na filtru z aktivního uhlí kryjícím aplikační zařízení (viz obrázek 1). Důležité je, aby žádné aplikační zařízení nepoškozovalo kůži, neabsorbovalo zkoušený přípravek, ani s ním nereagovalo. Zvířata jsou vracena do jednotlivých metabolických klecí ke sběru exkrementů.

1.4.8 **Doba trvání expozice a vzorkování**

Doba trvání expozice (expoziční doba) je časový interval mezi aplikací a odstraněním zkoušeného přípravku omytím kůže. Relevantní expoziční doby (obvykle 6 až 24 hodin) by měly být stanoveny na základě předpokládané doby expozice člověka. Po expoziční dobu jsou zvířata držena v metabolických klecích až do stanoveného ukončení. Zvířata by měla být v pravidelných intervalech po celou dobu trvání studie pozorována, zda nevykazují příznaky toxicity/abnormálních reakcí. Na konci expoziční doby by exponovaná kůže měla být prohlédnuta ke zjištění viditelných příznaků dráždění.

Metabolické klece by měly umožnit separovaný sběr moči a výkalů během studie. Rovněž by měly umožnit sběr oxidu uhličitého s ^{14}C-uhlíkem a těkavé organické sloučeniny s ^{14}C-uhlíkem, které by měly být analyzovány, jestliže jich vzniká množství > 5 %. Moč, výkaly a zachycené plyny (např. oxid uhličitý s ^{14}C a těkavé organické sloučeniny s ^{14}C) by měly být odděleně sbírány pro každou skupinu v každém vzorkovacím čase. Pokud je dostatečně známo, že vzniká málo těkavých radioaktivních metabolitů nebo nevznikají žádné, lze použít otevřené klece.

Exkrementy jsou sbírány během expoziční doby, až 24 hodin od počátečního styku s kůží, a potom denně až do ukončení experimentu. Ačkoli normálně postačí tři intervaly sběru exkrementů, z předpokládaného použití zkoušeného přípravku nebo ze známých kinetických údajů mohou vyplynout vhodnější nebo dodatečné časy sběru exkrementů pro studii.

Po uplynutí expoziční doby je ochranný kryt odstraněn z každého zvířete a uchován pro analýzu odděleně. Exponovaná kůže všech zvířat by měla být omyta nejméně třikrát čisticím činidlem užitím vhodných tamponů. Pečlivě je nutno dbát na to, aby se vyloučila kontaminace jiných částí těla. Čisticí činidlo by mělo představovat obvyklou hygienickou praxi, např. vodný roztok mýdla. Nakonec by měla být kůže vysušena. Veškeré tampony a mycí činidla by měla být zachována pro analýzu. Před vrácením do jednotlivých klecí by měla být exponovaná místa zvířat, která budou zachována pro pozdější pozorování, chráněna čerstvým krytem.

▼B

1.4.9 **Terminální postupy**

V každé skupině budou jednotlivá zvířata usmrcována v plánovaných časových intervalech a krev sbírána k analýze. Ochranný kryt nebo zařízení by mělo být odebráno k analýze. Kůže z aplikačního místa a podobná neexponovaná oblast kůže zbavené srsti by měla být odebrána ke zvláštní analýze z každého zvířete. Kůže z aplikačního místa může být rozdělena oddělením *stratum corneum* od podložní epidermis ke zjištění více údajů o distribuci zkoušené chemické látky. Stanovení časové závislosti této distribuce po expoziční době by mělo poskytnout určité údaje o osudu zkoušené chemické látky v *stratum corneum*. Rozdělení kůže (po posledním omytí kůže a usmrcení zvířete) je usnadněno sejmutím všech ochranných krytů. Kůže z aplikačního místa spolu s prstencem okolní kůže je vyříznuta z potkana a přišpendlena na desku. Na povrch kůže se jemně přitlačí lepící páska a tato pásku se sejme spolu s částí *stratum corneum*. Stejně se použijí další pásky až do stavu, kdy se páska na kůži již nelepí a *stratum corneum* je úplně odstraněno. Pro každé zvíře jsou všechny pásky společně dány do stejného obalu, kam je přidáno digestivum solubilizující *stratum corneum*. Před analýzou absorbované dávky ve zbylém těle z něj lze vyjmout jakoukoli potenciálně cílovou tkáň. Těla jednotlivých zvířat by měla být zachována pro analýzu. Obvykle postačí analýza celkového obsahu. Cílové orgány lze vyjímat pro zvláštní analýzu (pokud tak indikují další studie). Moč z měchýře v plánované době usmrcení by měla být přidána k moči sebrané dříve. Po sběru exkrementů z metabolických klecí v plánovaném době usmrcení by klece a jejich filtry měly být omyty vhodným rozpouštědlem. Podobně by měla být analyzována i další potenciálně kontaminovaná zařízení.

1.4.10 **Analýza**

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchytu (výtěžku) (tj. střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Znovuzáchyty mimo tento rozsah musí být zdůvodněny. Množství podané dávky v každém vzorku musí být analyzováno vhodně validovaným postupem.

Statistické hodnocení by mělo zahrnout míru rozptylu opakovaných měření pro každou aplikaci.

2. **ÚDAJE**

Pro každé zvíře v každém vzorkovacím čase by pro zkoušenou chemickou látku a/nebo metabolity měla být provedena následující měření. Kromě jednotlivých údajů by měly být hlášeny střední hodnoty dat seskupených podle vzorkovacích časů:

— množství spojené s ochrannými prostředky,

— množství, které lze uvolnit z kůže,

— množství na kůži či v kůži, které nelze z kůže smýt,

▼B

— množství ve vzorcích krve,

— množství v exkrementech a vydechovaném vzduchu (je-li to relevantní),

— množství v těle a v orgánech odebraných pro zvláštní analýzy.

Množství zkoušené chemické látky a/nebo metabolity v exkrementech, ve vydechovaném vzduchu, v krvi a v těle umožní stanovení celkového absorbovaného množství v každém vzorkovacím čase. Rovněž lze vyčíslit měrné množství zkoušené chemické látky absorbované jedním cm^2 kůže exponované zkoušené látce během expoziční doby.

3. **ZPRÁVY**

3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li známo; zdroj; čistota (radiochemická čistota); známé nečistoty; číslo šarže),

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, molární hmotnost a rozdělovací koeficient log P_{ow}).

Zkoušený přípravek:

— složení a zdůvodnění použití,

— podrobnosti o zkušebním přípravku, aplikované množství, dosažená koncentrace, vehikulum, stabilita a homogenita.

Pokusná zvířata:

— použitý druh a kmen,

— počet, věk a stáří zvířat,

— zdroj zvířat, podmínky jejich umístění, krmení, atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na počátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— podrobnosti podání zkušebního přípravku (místo aplikace, metody analýz, uzavřený/neuzavřený ochranný kryt, objem, extrakce, detekce),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody.

Výsledky:

— všechny známky toxicity,

— tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl),

▼B

— celkové znovuzachycené množství v experimentu,

— interpretace výsledků, srovnání s dostupnými údaji o perkutánní absorpci zkoušené sloučeniny.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Zkušební metoda B.45 Absorpce kůží: Metoda *in vitro*.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829–835.

5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

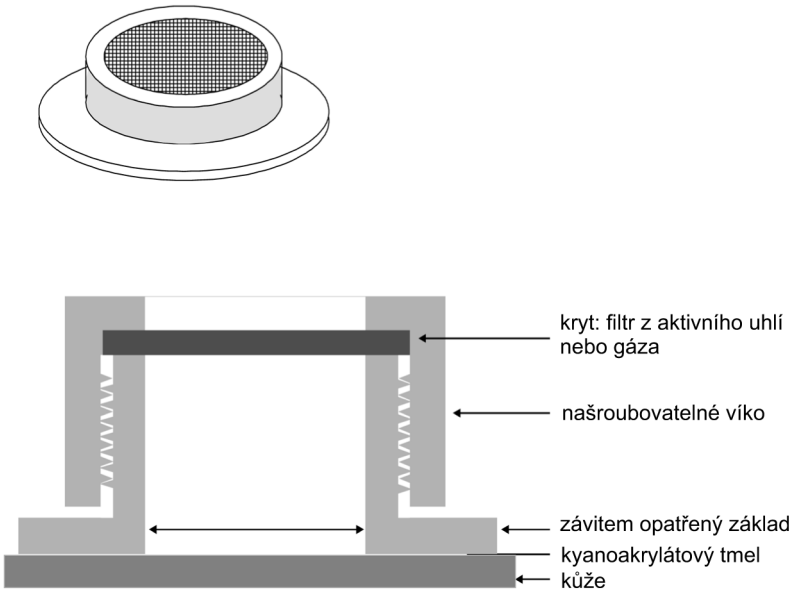
8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369–373.

9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399–404.

▼B

Obrázek 1

Příklad konstrukce typického zařízení k definování a ochraně místa dermální aplikace během studie perkutánní absorpce



▼B

B.45 **ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO***

1. **METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná testu OECD TG 428 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato metoda byla určena ke zjištění informací o absorpci zkoušených látek aplikované na vyříznutou kůži. Může být buď kombinována s metodou Absorpce kůží: metoda *in vivo* (1), nebo může být provedena samostatně. Při návrhu studií založených na této metodě se doporučuje se konzultovat dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2). Tento metodický dokument byl vypracován pro usnadnění výběru vhodných postupů *in vitro* pro specifické podmínky v zájmu zajištění spolehlivosti výsledků získaných touto metodou.

Metody měření absorpce kůží a dermálního přenosu lze dělit do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* pro absorpci kůží jsou dobře zavedeny a poskytují farmakokinetické údaje o širokém spektru živočišných druhů. Metoda *in vivo* je samostatně popsána v jiné zkušební metodě (1). Metody *in vitro* jsou používány k měření absorpce kůží po mnoho let. Ačkoli formální validační studie metod *in vitro*, na něž se vztahuje tato zkušební metoda, provedeny nebyly, odborníci OECD se shodli v roce 1999 na tom, že existovaly dostatečné údaje, které byly vyhodnoceny tak, že hovoří ve prospěch této metody *in vitro* (3). Další podrobnosti, které dokládají tuto podporu, včetně značného počtu přímých porovnání metod *in vitro* a *in vivo*, jsou uvedeny v metodickém dokumentu OECD Guidance Document (2). Této problematice se věnuje řada monografií, které uvádějí také podrobné základy pro využívání metod *in vitro* (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Metody *in vitro* umožňují měřit difusi chemických látek do kůže a přes kůži do rezervoáru tekutiny a mohou využívat neživotaschopnou kůži k měření samotné difuse, anebo čerstvou, metabolicky aktivní kůži k současnému měření difuse a kožního metabolismu. Tyto metody našly zvláštní použití při porovnávání přenosu chemických látek do kůže a přes kůži z různých směsí a mohou rovněž skýtat užitečné modely pro posuzování perkutánní absorpce u člověka.

Metody *in vitro* nemusejí být použitelné za všech situací a pro všechny třídy chemických látek. Zkušební metody *in vitro* lze využívat pro počáteční kvalitativní vyhodnocení pronikání kůží. V určitých případech může být nutné poté zjistit údaje *in vivo*. Při dalším rozpracování otázky okolností, za kterých by byly vhodné *in vitro* metody, by měl být brán v úvahu metodický dokument (2). Dodatečné podrobné údaje na podporu rozhodnutí jsou uvedeny v (3).

Tato metoda uvádí obecné zásady měření absorpce kůží a dermálního přenosu zkoušené látky užitím vyříznuté kůže. Lze použít kůži z mnoha savčích druhů, včetně kůže lidské. Permeabilní vlastnosti kůže jsou po jejím vyříznutí z těla zachovány, neboť hlavní barieru pro difusi představuje neživá rohová vrstva *stratum corneum*; aktivní přenos chemických látek kůží nebyl zjištěn. Byla prokázána schopnost kůže metabolizovat určité chemické látky během perkutánní absorpce (6), ale tento proces není určující, pokud jde o rozsah skutečně absorbované dávky, ačkoli může ovlivnit povahu materiálu vstupujícího do krevního řečiště.

▼B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavírajícím krytu, včetně množství prokazatelně odtěkané z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vitro*): hmotnost zkušební látky proniklé do recepční tekutiny nebo do systémovém oběhu během určitého časového období.

Absorbovatelná dávka (*in vitro*): množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, která může být označena radioaktivním izotopem, je aplikována na povrch vzorku kůže oddělující dvě komory difusní cely. Dotyčná chemická látka zůstává na kůži určitou dobu za stanovených podmínek před jejím odstraněním vhodným čisticím postupem. Recepční tekutina je vzorkována ve vhodných časových intervalech během experimentu a analyzována na obsah zkoušené chemické látky a/nebo metabolitů.

Jsou-li použity metabolicky aktivní systémy, mohou být vhodnými metodami analyzovány metabolity zkoušené chemické látky. Po skončení experimentu je případně kvantifikována distribuce zkoušené chemické látky a jejich metabolitů.

Za vhodných podmínek, které jsou popsány v této metodě a v metodickém dokumentu (2), je měřena absorpce zkoušené látky během dané doby analýzou recepční tekutiny a exponované kůže. Zkoušená látka zbývající v kůži by měla být pokládána za absorbovanou, nelze-li prokázat, že absorpci lze stanovit z hodnot recepční tekutiny samotné. Analýza dalších složek (materiálu omytého z kůže a materiálu, který zůstal ve vrstvách kůže) umožňuje další vyhodnocení údajů, včetně celkové distribuce zkušební látky a procentní podíl znovuzáchytu.

V zájmu prokázání funkčnosti a spolehlivosti zkušebního systému v provádějící laboratoři by měly být dostupné výsledky pro relevantní referenční látky v souladu s publikovanými výsledky pro použitou metodu. Tento požadavek by mohl být splněn zkoušením vhodných referenčních látek (přednostně s lipofilitou blízkou zkoušené látce) souběžně se zkoušenou látkou nebo poskytnutím dostatečných stávajících výsledků pro řadu referenčních látek různé lipofility (např. kofein, kyselina benzoová a testosteron).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Difusní cela**

Difusní cela se skládá z donorové komory a recepční komory, mezi nimiž je umístěna kůže (příklad obvyklé konstrukce je uveden na obrázku 1). Cela by měla zajistit dobré utěsnění okolo kůže, umožňovat snadné vzorkování a dobré promíchávání recepčního roztoku ve styku se spodní vrstvou kůže a dobrou regulaci teploty cely a jejího obsahu. Přijatelné jsou jak statické, tak průtočné difusní cely. Obvykle je ponechána donorová cela neuzavřená během expozice konečné dávce zkušebního preparátu. Avšak pro neurčité aplikace a určité scénáře pro konečnou dávku může být donorová cela uzavřena.

▼B

1.4.2 **Recepční tekutina**

Přednost se dává používání fyziologicky příznivých recepčních tekutin, ačkoliv lze používat i jiné, je-li to odůvodněné. Přesné složení recepční tekutiny by mělo být uvedeno. Měla by být prokázána dostatečná rozpustnost zkoušené chemické látky v recepční tekutině tak, aby netvořily překážku absorpce. Navíc by recepční tekutina neměla poškozovat kožní preparát. V průtočném systému nesmí rychlost toku brzdit difusi zkoušené látky do recepční tekutiny. V systémech statické cely by kapalina měla být neustále míchána a pravidelně vzorkována. Je-li studován metabolismus, musí recepční tekutina během experimentu podporovat životaschopnost kůže.

1.4.3 **Kožní preparáty**

Lze používat kůži z lidských a zvířecích zdrojů. Zohledňuje se, že používání lidské kůže podléhá vnitrostátním a mezinárodním etickým ohledům a podmínkám. Ačkoli je preferována životaschopná kůže, lze též použít kůži neživou za předpokladu, že lze prokázat její neporušenost. Přijatelné jsou buď epidermální membrány (separované enzymaticky, teplem nebo chemicky) nebo kůže s rozštěpenou tloušťkou (štěpený kožní transplantát) (obvykle s tloušťkou 200–400 μm) připravené za použití dermatomu. Plná tloušťka kůže může být použita, ale nadměrná tloušťka (přibližně > 1 mm) by měla být vyloučena, pokud není konkrétně žádoucí pro stanovení zkoušené chemické látky ve vrstvách kůže. Výběr druhů, anatomického místa a postupu preparace musí být zdůvodněn. Požadovány jsou přijatelné údaje nejméně ze čtyř opakování s jedním zkušebním preparátem.

1.4.4 **Neporušenost kožního preparátu**

Je nutné, aby kůže byla řádně preparována. Nevhodná manipulace s kůží může vést k poškození vrstvy *stratum corneum*, proto musí být neporušenost kožního preparátu kontrolována. Je-li zkoumán kožní metabolismus, měla by čerstvě vyříznutá kůže být použita co nejdříve a za podmínek známých jako příznivé pro metabolickou činnost. Obecně se doporučuje čerstvě vyříznutou kůži použít do 24 hodin, avšak přijatelná skladovací doba se může lišit v závislosti na enzymovém systému zapojeném do metabolizace a na teplotě skladování (13). Jsou-li kožní preparáty před použitím skladovány, měly by být uvedeny důkazy o zachování jejich bariérové funkčnosti.

1.4.5 **Zkoušená chemická látka**

Zkoušená látka je entita, jejíž schopnosti pronikání mají být studovány.V ideálním případě by měla být označena radioaktivním izotopem.

1.4.6 **Zkoušený přípravek**

Přípravek zkušební látky (např. čistý, zředěný nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponováni (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna.

▼B

1.4.7 **Koncentrace a přípravky zkoušené látky**

Obvykle je použita více než jedna koncentrace zkoušené látky zahrnující maximální potenciální expozice člověka. Podobně by mělo být uváženo zkoušení určitého spektra skladby obvyklých přípravků.

1.4.8 **Aplikace na kůži**

Za běžných podmínek expozice lidí chemickým látkám se obvykle setkáváme s konečnými dávkami. Proto by mělo být aplikováno množství, které imituje expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm^2 kůže pro tuhé látky a až 10 µl/cm^2 pro kapaliny. Aplikované množství by mělo být zdůvodněno předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Např. aplikace na povrch kůže může být neurčitá, jsou-li aplikovány velké objemy na jednotku plochy.

1.4.9 **Teplota**

Pasivní difuse chemických látek (a tudíž i jejich absorpce kůží) závisí na teplotě. Difusní komora a kůže by měly být udržovány při konstantní teplotě blízké normální teplotě kůže okolo 32 ± 1 ºC. Různé konstrukce cely budou vyžadovat různou vodní lázeň nebo teplotu vyhřívaných bloků k zajištění toho, aby byl dotyčný receptor kůže temperován na svůj fyziologický standard. Vlhkost by měla být přednostně v rozmezí 30 až 70 %.

1.4.10 **Doba trvání expozice a vzorkování**

Expozice kůže zkoušenému přípravku může trvat po celou dobu experimentu nebo po kratší doby (tj. může imitovat specifické typy lidské expozice). Kůže by měla být omytím zbavena nadbytku zkušebního preparátu relevantním čisticím činidlem a tato činidla by měla být sebrána pro účely analýzy. Tyto postupy očištění od zkoušeného přípravku závisí na předpokládaných podmínkách použití a měly by být zdůvodněny. Obvykle se požaduje doba vzorkování 24 hodin, aby bylo možno dostatečně charakterizovat absorpční profil. Doba vzorkování by za normálních okolností neměla přesáhnout 24 hodin, neboť po této době se neporušenost kůže může začít horšit. V případě zkoušených látek rychle pronikající kůží to nemusí být nutné, v případě látek pronikajících kůží pomalu však není vyloučena nutnost delších dob. Frekvence vzorkování recepční tekutiny by měla umožnit grafickou prezentaci absorpční profil zkoušené látky.

1.4.11 **Terminální postupy**

Všechny složky zkušebního systému by měly být analyzovány a měl by být stanoven výtěžek znovuzáchytu. To zahrnuje donorovu komoru, oplachy povrchu kůže, kožní preparát a recepční tekutinu/komoru. V některých případech může být kůže frakcionována na exponovaný povrch kůže a povrch kůže pod přírubou cely a na frakce vrstvy *stratum corneum*, epidermis a dermis k odděleným analýzám.

1.4.12 **Analýza**

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchytu (cílem by mělo být dosažení střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Množství zkoušené látky v receptorové tekutině, v kožním preparátu, ve zbytcích po očištění povrchu kůže a oplachu aparatury by měly být analyzováno vhodným postupem.

▼B

2. **ÚDAJE**

Prezentovány by měly být údaje o analýze receptorové tekutiny, distribuci zkoušené chemické látky a časové závislosti absorpčního profilu. Pro podmínky expozice konečnou dávkou by mělo být vypočteno množství omyté z kůže, množství spojené s kůží (a v různých vrstvách kůže, je-li analyzováno) a množství obsažené v recepční tekutině (podíl a množství nebo procentní podíl aplikované dávky). Absorpce kůží může být v některých případech vyjádřena pouze užitím údajů o recepční tekutině. Zůstává-li však zkoušená látka v kůži při skončení studie, může být nutné toto množství zahrnout do celkového absorbovaného množství (viz odkaz na literaturu 3, odstavec 66). Pro podmínky expozice neurčitou dávkou mohou údaje umožnit výpočet permeabilní konstanty (Kp). Za těchto podmínek není absorbovaný procentní podíl relevantní.

3. **ZPRÁVY**

3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (přinejmenším molární hmotnost a rozdělovací koeficient log P_{ow}), čistota (radiochemická čistota),

— identifikační údaje (např. číslo šarže),

— rozpustnost v recepční tekutině.

Zkoušený přípravek:

— složení a zdůvodnění použití,

— homogenita.

Zkušební podmínky:

— zdroj a místo kůže, metoda preparace, podmínky skladování před použitím, všechny předúpravy (čištění, antibiotické ošetření atd.), zjišťování neporušenosti kůže, metabolický status, zdůvodnění použití,

— konstrukce cely, složení recepční tekutiny, rychlost toku recepční tekutiny nebo doby a postupy vzorkování,

— podrobnosti aplikace zkoušeného přípravku a kvantifikace aplikované dávky,

— doba expozice,

— podrobnosti odstranění zkoušeného přípravku z kůže, např. oplachem kůže,

— podrobnosti analýzy kůže a frakcionačních postupů použitých ke zjištění distribuce v kůži,

▼B

— postupy mytí cely a zařízení,

— metody stanovení, extrakční postupy, meze detekce a validace analytických metod.

Výsledky:

— celkový znovuzáchyt experimentu (aplikovaná dávka = obsah v mycích činidlech z kůže + obsah v kůži + obsah v recepční tekutině + obsah v mycích činidlech cely),

— tabelované výsledné znovuzáchyty jednotlivých cel v každém kompartmentu,

— absorpční profil,

— tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl).

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Zkušební metoda B.44 Absorpce kůží: metoda *in vivo*.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, s. 237–241.

6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

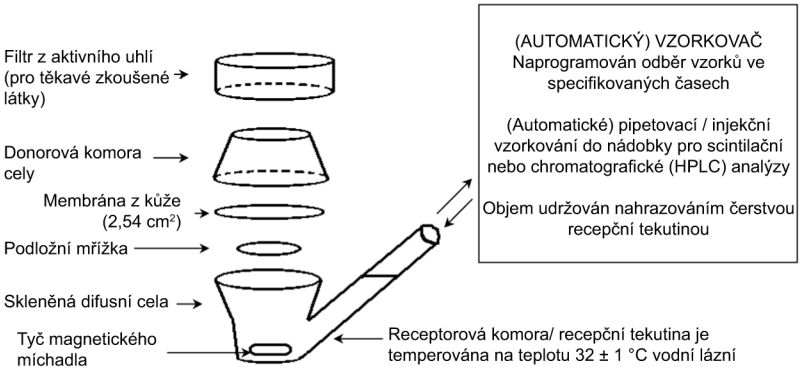
11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Obrázek 1

Příklad obvyklé konstrukce statické difusní cely pro studie perkutánní absorpce *in vitro*



▼M3

B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

ÚVOD

1. Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky v délce 4 hodin (jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (1) (3)). Tato zkušební metoda poskytuje postup *in vitro*, který lze použít k určení nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látek a směsí) patřících v rámci systému GHS OSN a podle výše uvedeného nařízení EU o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP) do kategorie 2 (1) (2) (3). V Evropské unii a dalších oblastech, které nepřijaly volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN (slabě dráždivé látky), se může tato ZM rovněž používat k identifikaci nezatříděných látek, tzn. látek označovaných v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“ (1) (3). Tuto ZM lze používat k určení dráždivých účinků chemických látek na kůži jakožto samostatnou zkoušku nahrazující zkoušky dráždění kůže *in vivo* v rámci strategie odstupňovaného zkoušení (4 a kapitola B.4 této přílohy).

2. Hodnocení dráždění kůže obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat (zkušební metodika OECD č. 404; kapitola B.4 této přílohy) (4). V souvislosti s ohledy na dobré životní podmínky zvířat byla metoda podle kapitoly B.4 v roce 2004 přepracována, aby umožňovala určit poleptání/dráždění kůže uplatněním strategie odstupňovaného zkoušení za použití validovaných metod *in vitro* a *ex vivo*, takže lze zabránit bolesti a utrpení zvířat. Tři validované zkušební metody *in vitro* byly přijaty jako zkušební metodiky OECD č. 430, 431 a 435 (5) (6) (7) a dvě z nich jako kapitoly B.40a B.40 a této přílohy a mají se používat pro tu část strategie odstupňovaného zkoušení podle kapitoly B.4 nebo zkušební metodika OECD č. 404, která se týká poleptání (4).

3. Tato ZM se týká ukazatelů dráždění kůže z hlediska lidského zdraví. Je založena na použití rekonstruované lidské epidermis, která svým celkovým uspořádáním (použitím netransformovaných keratinocytů získaných z lidské epidermis jakožto zdroje buněk, a použitím reprezentativní tkáně a cytoarchitektury) věrně napodobuje biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. epidermis. Tato ZM rovněž obsahuje sadu standardů funkčnosti (Příloha 2) pro posuzování podobných a modifikovaných metod založených na použití rekonstruované lidské epidermis vyvinutou Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (EC-ECVAM) (8), v souladu se zásadami uvedenými v Pokynu OECD č. 34 (9).

4. K dispozici jsou tři ověřené metody, které se drží této ZM. Pro zkušební metodu *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis, komerčně dostupné jako EpiSkin™, (označenou jako validovaná referenční metoda – VRM) byly provedeny prevalidační, optimalizační a validační studie (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Dvě další komerčně dostupné metody*in vitro* pro zkoušení dráždění kůže za použití rekonstruované lidské epidermis vykazují podle validace na základě standardů funkčnosti podobné výsledky jako VRM (21). Jedná se o metody EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE (22).

▼M3

5. Nežli lze pro regulační účely použít navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkoušku *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis – jinou než VRM a zkušební metody EpiDerm™ SIT (EPI-200) nebo SkinEthic™ RHE – je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistilo, že je lze považovat za srovnatelné s odpovídajícími ukazateli VRM v souladu se standardy funkčnosti stanovenými v této ZM (dodatek 2). Kromě toho se doporučuje před zahájením vývoje a validace podobné nebo modifikované metody *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis a jejím předložením k přijetí regulačním orgánem prostudovat si vysvětlující dokument OECD o zkoumání dráždění kůže *in vitro* (23).

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Jak prokazuje validační studie (16), omezením této ZM je to, že neumožňuje zatřídění chemických látek do volitelné kategorie 3 v rámci systému GHS OSN (slabě dráždivé látky) (1). Pokud se tato ZM používá jako částečná náhradní zkouška, může být nezbytné následné testování *in vivo*, aby bylo možno plně charakterizovat potenciál látky dráždit kůži (4 a kapitola B.4 této přílohy). Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

8. Tato ZM se týká té části strategie odstupňovaného zkoušení poleptání nebo dráždění kůže podle kapitoly B.4 (zkušební metodika OECD č. 404), která spočívá ve zkoušce dráždění kůže *in vitro* (4). Jelikož tato ZM neposkytuje odpovídající informace o poleptání kůže, je třeba poznamenat, že kapitola B.40a (zkušební metodika OECD č. 431) o poleptání kůže je založena na tomtéž zkušebním systému za použití rekonstruované lidské epidermis, i když podle jiného protokolu (kapitola B.40a). Tato metoda je založena na modelech rekonstruované lidské epidermis s použitím lidských keratinocytů, které proto představují cílový orgán *in vitro* zájmového biologického druhu. Kromě toho se přímo týká prvního stupně zánětlivé kaskády/mechanismu účinku (poškození buněk a poškození tkání vedoucí ke vzniku lokalizovaného traumatu), k němuž dochází při podráždění *in vivo*. Při validaci této ZM byla testována široká škála chemických látek a empirická databáze validační studie obsahuje celkem 58 látek (16) (18) (23). Týká se to pevných látek, kapalin, polotuhých látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by se před aplikací měly pokud možno rozmělnit do podoby jemného prášku; žádná další předběžná úprava vzorku není nutná. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny (24). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná ZM zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje. Je třeba také poznamenat, že velmi barevné chemické látky mohou ovlivnit měření životaschopnosti buněk, a je proto za účelem korekcí nutno použít přizpůsobené kontroly (viz odstavce 24 až 26).

9. U zkoušené látky s jednoznačným zatříděním by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití tří tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 50 ± 5 %, by se mělo zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

▼M3

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.

11. Chemicky vyvolané podráždění kůže, které se projevuje zarudnutím (erytém) a otokem (edém), je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím látky skrze *stratum corneum* a poškozením pod ním ležících vrstev keratinocytů. Z umírajících keratinocytů se uvolňují mediátory, které zahajují zánětlivou kaskádu, jež působí na buňky v *dermis*, zejména na stromatické a endoteliální buňky. Jedná se o rozšíření a zvýšení propustnosti endoteliálních buněk, při němž vzniká pozorovaný erytém a edém (24). Metody založené na použití rekonstruované lidské epidermis měří počáteční události kaskády.

12. Životaschopnost buněk modelů rekonstruované lidské epidermis se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, číslo CAS 298–93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (25). Dráždivé látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. ≤ 50 % pro dráždivé látky patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2). V závislosti na právním rámci, v němž se výsledky této ZM používají, lze chemické látky, při jejichž použití životaschopnost buněk přesahuje stanovenou prahovou úroveň, považovat za nedráždivé (tzn. > 50 %, „Bez kategorie“).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

13. Před zahájením běžného používání některé z těchto tří validovaných metod, které se drží této ZM, by měly laboratoře prokázat svoji technickou způsobilost za použití deseti srovnávacích látek uvedených v tabulce 1. V případě podobných metod vyvinutých podle této ZM nebo v případě modifikací kterékoli ze tří validovaných metod je nutno splnit požadavky standardů funkčnosti uvedené v Příloze 2 této ZM, nežli lze metodu začít používat pro účely regulačního zkoušení.

14. V rámci prokazování způsobilosti se doporučuje, aby uživatel po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřil bariérové vlastnosti tkání uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je metoda úspěšně zavedena a je prokázána způsobilost správně tuto metodu používat, není nutno běžně provádět takové ověřování. Při běžném používání metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

Tabulka 1

Srovnávací látky ([1])

Chemická látka	Číslo CAS	Skóre *in vivo* ([2])	Skupenství	Kategorie podle GHS OSN/ nařízení CLP EU
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	pevné	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	kapalné	Bez kategorie

▼M3

Chemická látka	Číslo CAS	Skóre *in vivo* (2)	Skupenství	Kategorie podle GHS OSN/ nařízení CLP EU
methyl-stearát	112-61-8	1	pevné	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kapalné	Bez kategorie (*Volitelná kat. 3*) (3), (4)
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kapalné	Bez kategorie (*Volitelná kat. 3*) (3), (4)
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	kapalné	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	kapalné	Kat. 2
hydroxid sodný (5 % vod.)	1310-58-3	3	kapalné	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	3,3	pevné	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	kapalné	Kat. 2

(1) Tyto srovnávací látky jsou podmnožinou srovnávacích látek použitých ve validační studii.
(2) Skóre *in vivo* podle kapitoly B.4 a zkušební metodiky OECD č. 404 (4).
(3) rámci této zkušební metody se látky patřící podle systému GHS OSN do volitelné kategorie 3 (slabě dráždivé látky) (1) považují za látky s označením „Bez kategorie“.
(4) Podle nařízení CLP Evropské unie nelze volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN použít.

POSTUP

15. Následuje popis složek a postupů zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis při hodnocení dráždění kůže. Měl by být rekonstruován model lidské epidermis a lze jej rovněž připravit interně nebo získat na trhu. K dispozici jsou standardní prováděcí postupy pro metody EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE (26) (27) (28). Zkoušení by se mělo provádět následujícím způsobem:

Složky zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis

Všeobecné podmínky

16. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkčním *stratum corneum* by měly být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum, stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Funkce bariéry by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci látky markeru v pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské epidermis by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské epidermis by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

▼M3

Funkční podmínky

Životaschopnost

17. K určení míry životaschopnosti se používá zkouška MTT (25). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Optická hustota (OD) samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro hodnoty OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody pro určení dráždění kůže) stanoví subjekt, který vyvinul nebo dodává model rekonstruované lidské epidermis, a rozsahy přijatelnosti pro 3 validované metody jsou uvedeny v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti) po dobu trvání zkušební doby expozice.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Bariérová funkce

18. *Stratum corneum* a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. SDS nebo Triton X-100, podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3).

Morfologie

19. Mělo by se provést histologické vyšetření modelu rekonstruované lidské epidermis, které prokáže strukturu podobnou lidské *epidermis* (včetně vícevrstevného *stratum corneum*).

Reprodukovatelnost

20. Výsledky zkušební metody za použití pozitivní kontrolní látky a negativních kontrol by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

21. Subjekt, který vyvinul nebo dodává model rekonstruované lidské epidermis, by měl zajistit a prokázat, že každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 17), *bariérové funkce* (odstavec 18) a *morfologie* (odstavec 19). Tyto údaje by měly být poskytovány uživatelům metody, aby je mohli uvést v protokolu o zkoušce. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} je zapotřebí zjistit u subjektu, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává (nebo u zkoušejícího, pokud se používá vlastní model). Pro spolehlivou predikci zatřídění zkoušené látky co do dráždivosti mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití náležitých tkání. Jako příklad jsou v tabulce 3 uvedeny rozsahy přijatelnosti pro tři validované referenční metody.

▼M3

Tabulka 3

Příklady kritérií kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	ET_{50} = 4,8 hod.	ET_{50} = 8,7 hod.
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(28)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 9,0 hod.

Aplikace zkoušené látky a kontrolní látky

22. Pro každou zkoušenou látku a pro kontroly by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň tři replikáty. V případě kapalných a pevných látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkušební látky, aby rovnoměrně pokryla povrch *epidermis*, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. že je třeba použít nejméně 25 μL/cm^2 nebo 25 mg/cm^2. V případě pevných látek je nutno povrch *epidermis* před nanesením zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené látky s povrchem *epidermis*. Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Na konci expoziční doby je nutno zkušební látku pečlivě spláchnout z povrchu *epidermis* vodným pufrem nebo 0,9 % roztokem NaCl. V závislosti na tom, která ze tří validovaných metod s použitím rekonstruované lidské epidermis se použije, se doba expozice pohybuje v rozmezí od 15 do 60 minut a teplota inkubace v rozmezí od 20 do 37 °C. Tyto expoziční doby a teploty jsou optimalizovány pro každou metodu s použitím rekonstruované lidské epidermis a představují různé inherentní vlastnosti dotyčných metod. Podrobnosti viz standardní prováděcí postupy jednotlivých metod (26) (27) (28).

23. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativní kontroly), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí dosavadních hodnot přijatelnosti. Navrhovanou pozitivní kontrolou je 5 % vodný SDS. Navrhovanými látkami pro negativní kontrolu jsou voda a fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

Měření životaschopnosti buněk

24. Nejdůležitějším prvkem zkušebního postupu je to, že se měření životaschopnosti neprovádí okamžitě po expozici působení zkoušených látek, ale až po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření tkání opláchnutých v čerstvém médiu. Tato doba umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i vznik jasných známek cytotoxických účinků. Během optimalizační fáze zkoušky (11) (12) (13) (14) (15) se jako optimální ukázala 42 hodinová inkubační doba po ošetření.

25. Zkouška MTT je kvantitativní validovaná metoda, která by se měla používat k měření životaschopnosti buněk podle této ZM. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové soustavy. Vzorek tkáně se na dobu 3 hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3 až 1 mg/ml). Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm.

▼M3

26. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT mohou zkoušku ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti (protože zkoušená látka může zabránit vybarvení, změnit zabarvení v opačné, nebo naopak může vybarvení způsobit). K tomu může dojít v případě, že se určitá zkoušená látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*. Jestliže zkoušená látka působí přímo na MTT (tzn. že jej redukuje), má přirozené zabarvení nebo se zabarví během svého působení na tkáň, pak jsou ke zjištění interference zkoušené látky s postupem měření životaschopnosti buněk a ke korekci této interference zapotřebí dodatečné kontroly. Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, naleznete ve standardních prováděcích postupech výše uvedených tří validovaných metod (26) (27) (28).

Kritéria přijatelnosti

27. U každé metody s použitím platných šarží modelu rekonstruované lidské epidermis (viz odstavec 21) by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle protokolu zkoušky. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. 5 % vodným SDS, měly odrážet svou schopnost reagovat na dráždivou látku v podmínkách ZM (26) (27) (28). Je nutno vymezit související vhodné hodnoty variability mezi tkáňovými replikáty (např. pokud se používají standardní odchylky (SD), měly by být v rozmezí jednostranného 95 % tolerančního intervalu vypočteného z dosavadních údajů; u VRM by měla být SD < 18 %).

Interpretace výsledků a predikční model

28. Hodnoty OD získané s každou zkoušenou látkou lze použít k výpočtu procentuálního podílu životaschopnosti buněk normalizovaného podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Je zapotřebí jasně vymezit, zdokumentovat a v případě potřeby prokázat mezní hodnotu procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišující dráždivou látku od nezatříděných zkoušených látek a statistický postup (statistické postupy) použité k vyhodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek. Mezní hodnoty pro predikci dráždění jsou uvedeny níže:

— Zkoušená látka je považována za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP Evropské unie, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna (≤) 50 %.

— V závislosti na právním rámci, v němž se výsledky této ZM používají, lze zkoušenou látku považovat za nedráždivou pro kůži v souladu s označením „Bez kategorie“ v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP Evropské unie, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření větší než (>) 50 %.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

29. Za každé provedení zkoušky by se údaje získané za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítané údaje procentuální životaschopnosti buněk pro každou zkoušenou látku, a to včetně jejího zatřídění) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Navíc je za každé provedení zkoušky nutno vykázat průměr ± standardní odchylku. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou látku.

▼**M3**

Protokol o zkoušce

30. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

— chemický název (chemické názvy), například název CAS a číslo CAS, název a číslo podle klasifikace ES, jsou-li známy,

— čistota a složení látky (v hmotnostních procentech),

— fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provádění studie (např. skupenství, stabilita, těkavost, pH a rozpustnost ve vodě, jsou-li známy),

— případné ošetření zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřívání, mletí),

— podmínky uchovávání.

Odůvodnění použitého modelu rekonstruované lidské epidermis a protokolu

Zkušební podmínky:

— použitý buněčný systém,

— úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:

  i) životaschopnost,

  ii) bariérovou funkci,

  iii) morfologii,

  iv) reprodukovatelnost a předvídatelnost,

  v) kontroly kvality modelu,

— podrobnosti použitého zkušebního postupu,

— použité zkušební dávky, doba expozice a doba inkubace po ošetření,

— popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,

— odkaz na dosavadní údaje modelu. Ty by měly zejména zahrnovat:

  i) přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na dosavadní údaje o šaržích,

  ii) přijatelnost hodnot pozitivních a negativních kontrol s odkazem na průměry a rozsahy pozitivních a negativních kontrol,

— popis použitých kritérií hodnocení včetně odůvodnění volby mezní hodnoty pro predikční model,

— odkaz na dosavadní údaje kontrol.

▼M3

Výsledky:

— údaje pro jednotlivé zkoušené látky za každé provedení zkoušky a měření každého replikátu, uspořádané do podoby tabulek,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, a/nebo pro zbarvující zkoušené látky,

— popis ostatních pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků

Závěr

LITERATURA

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. K dispozici na adrese: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html].

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(3) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231–243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min. – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, Úř. věst. L 225, 21.8.2001, s. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1–4.

(32) Jírová, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlová, K., Bendová, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109–116.

▼M3

Dodatek 1

Definice

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Životaschopnost buněk: Parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené hodnotě a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Soulad: Je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se používá namísto výrazu „přesnost“ a je vymezen jako podíl všech zkoušených látek, které jsou správně zatříděny jako pozitivní nebo negativní (9).

ET_{50}: Tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci látky markeru v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC_{50}.

Nařízení CLP Evropské unie (nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí): Toto nařízení provádí v Evropské unii (EU) systém GHS OSN pro klasifikace a označování chemikálií (látek a směsí) (3).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek vypracovaný Organizací spojených národů (OSN)): Systém navrhující klasifikaci chemikálií (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, za účelem poskytování informací o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

IC_{50}: Tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET_{50}.

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro zkušební metodu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Taková zkušební metoda by byla kandidátem pro dodatečnou validaci. Používá se namísto podobné zkušební metody (9).

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně i) zásadní složky zkušební metody, i) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (9).

Srovnávací látky: Chemické látky zvolené k použití při procesu validace, pro něž jsou již známy odezvy v rámci zkušebního systému *in vitro* nebo *in vivo* nebo odezvy u biologického druhu, který je předmětem zájmu daného zkoumání. Tyto chemické látky by měly být reprezentativními zástupci tříd chemických látek, u nichž se předpokládá používání dotyčné zkušební metody, a měly by představovat celou škálu reakcí, jež lze očekávat u chemických látek, pro něž se může zkušební metoda používat, od silné přes slabou až po negativní odezvu. Pro jednotlivé fáze procesu validace a pro různé zkušební metody a různá použití zkoušek mohou být potřebné rozdílné sady srovnávacích látek (9).

▼**M3**

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží ke určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené látky (9).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Dráždění kůže: Vyvolání reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky po dobu až 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající neimunogenní reakce, která se objevuje krátce po stimulaci (29). Její hlavní charakteristikou je reverzibilní povaha zahrnující zánětlivé reakce a většinu charakteristických klinických příznaků podráždění (erytém, edém, svědění a bolest) souvisejících se zánětlivým procesem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Strategie odstupňovaného zkoušení: Zkoušení, které využívá metody zkoušení postupným způsobem; zkušební metody se na každé následující úrovni volí na základě výsledků získaných na předchozí úrovni testování (9).

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M3

Dodatek 2

Standardy funkčnosti k posouzení navrhovaných podobných nebo modifikovaných metod pro zkoušení dráždění kůže *in vitro* za použití rekonstruované lidské *epidermis*

ÚVOD

1. Účelem standardů funkčnosti je stanovit základ, podle něhož lze určit, zda nové metody, a to jak chráněné (chráněné autorskými právy, chráněné ochrannými známkami, registrované), tak nechráněné, mají dostatečnou přesnost a spolehlivost pro konkrétní zkušební účely. Tyto standardy funkčnosti, založené na validovaných a uznávaných metodách, lze používat k hodnocení spolehlivosti a přesnosti jiných podobných metod (hovorově označovaných jako zkoušky typu „me-too“), které jsou založeny na podobných vědeckých zásadách a měří nebo predikují tentýž biologický nebo toxický účinek (9).

2. Před přijetím modifikovaných metod (tzn. navrhovaných možných vylepšení schválené zkušební metody) je třeba provést posouzení, které určí dopad navrhovaných změn na funkčnost zkoušky a také míru, v jaké tyto změny ovlivňují údaje, jež jsou k dispozici pro další složky procesu validace. V závislosti na počtu a povaze navrhovaných změn, na výsledných údajích a podkladech pro tyto změny by měly být navrhované metody podrobeny buď témuž procesu validace, jaký je stanoven pro novou zkušební metodu, nebo případně omezenému posouzení spolehlivosti a relevantnosti za použití stávajících standardů funkčnosti (9).

3. Podobné metody (typu „me-too“) nebo modifikované metody odvozené od kterékoli ze tří validovaných metod [EpiSkin™ (validovaná referenční metoda – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE] navrhované k použití v rámci této ZM je nutno vyhodnotit, aby se stanovila jejich spolehlivost a přesnost za použití látek zastupujících celý rozsah Draizeho škály dráždivosti. Při hodnocení za použití 20 srovnávacích látek doporučených ve standardech funkčnosti (tabulka 1) by navrhované podobné nebo modifikované metody měly mít hodnoty spolehlivosti a přesnosti, které jsou srovnatelné nebo lepší než hodnoty získané při použití VRM (tabulka 2) (2) (16). Hodnoty spolehlivosti a přesnosti, jichž by mělo být dosaženo, jsou uvedeny v odstavcích 8 až 12 tohoto dodatku. Seznam srovnávacích látek obsahuje nezatříděné látky (označované v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“) a zatříděné látky (patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2) (1), které zastupují různé třídy chemických látek, aby bylo možno spolehlivost a přesnost (citlivost, specifičnost a celkovou přesnost) navrhované metody porovnat s odpovídajícími hodnotami VRM. Spolehlivost metody, jakož i její schopnost správně určit dráždivé chemické látky patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2 a – v závislosti na regulačním rámci, pro který jsou získávané údaje určeny – také její schopnost správně určit látky označované v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“ je třeba stanovit ještě před jejím použitím pro zkoušení nových zkušebních látek.

4. Tyto standardy funkčnosti jsou založeny na standardech funkčnosti vypracovaných střediskem EC-ECVAM (8), aktualizovaných v souladu se systémy klasifikace a značení látek GHS OSN a CLP Evropské unie (1) (3). Původní standardy funkčnosti byly vymezeny po provedení validační studie (21) a byly založeny na klasifikačním systému EU stanoveném ve směrnici Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek ([1]). Vzhledem k přijetí systému GHS OSN pro klasifikaci a označování látek i v rámci EU (nařízení CLP Evropské

([1]) Úř. věst. L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M3

unie) (3), k němuž došlo v době mezi provedením validační studie a vypracováním této ZM, byly standardy funkčnosti aktualizovány (8). Tato aktualizace spočívá především ve změnách i) sady srovnávacích látek uvedených ve standardech funkčnosti a ii) stanovených hodnot spolehlivosti a přesnosti (2) (23).

STANDARDY FUNKČNOSTI PRO ZKUŠEBNÍ METODY *IN VITRO* POUŽÍVANÉ KE ZKOUŠKÁM DRÁŽDĚNÍ KŮŽE ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

5. Standardy funkčnosti jsou tvořeny těmito třemi prvky (9):

I. Zásadní složky zkušební metody;

II. Minimální seznam srovnávacích látek;

III. Definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti.

I. **Zásadní složky zkušební metody**

6. Patří mezi ně zásadní strukturní, funkční a procedurální prvky validované metody, které by měly být obsaženy v protokolu navrhované, mechanicky a funkčně podobné nebo modifikované metody. Tyto složky představují jedinečné vlastnosti metody, nejdůležitější procedurální podrobnosti a opatření pro kontrolu kvality. Dodržování zásadních složek zkušební metody pomůže zajistit, aby navrhovaná podobná nebo modifikovaná metoda byla založena na stejných pojmech jako odpovídající VRM (9). Základní součásti zkušební metody jsou podrobně popsány v odstavcích 16 až 21 ZM a zkoušení by se mělo provádět v souladu s:

— všeobecnými podmínkami (odstavec 16),

— funkčními podmínkami, mezi něž patří:

— životaschopnost buněk (odstavec 17),

— bariérová funkce (odstavec 18),

— morfologie (odstavec 19),

— reprodukovatelnost (odstavec 20) a

— kontrola kvality (odstavec 21).

II. **Minimální seznam srovnávacích látek**

7. Srovnávací látky slouží k rozhodnutí, zda navrhovaná podobná nebo modifikovaná metoda, u níž je prokázáno, že je strukturálně a funkčně dostatečně podobná validované referenční metodě (VRM), nebo která představuje drobnou úpravu jedné ze tří validovaných referenčních metod, má srovnatelnou nebo lepší spolehlivost a přesnost nežli VRM (2) (8) (16) (23). Seznam 20 doporučených srovnávacích látek uvedený v tabulce 1 obsahuje chemické látky, které zastupují různé třídy chemických látek (tzn. kategorie chemických látek na základě funkčních skupin) a jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky). Tento seznam obsahuje 10 látek patřících v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2 a 10 nezatříděných chemických látek, z nichž 3 jsou volitelné látky patřící v rámci systému GHS OSN do kategorie 3. V rámci této zkušební metody se látky volitelné kategorie 3 považují za látky s označením „Bez kategorie“. Chemické látky uvedené v tabulce 1 jsou vybrány z látek použitých v rámci optimalizační fáze, která následovala po prevalidaci, a ve validační studii VRM, s ohledem na chemickou funkčnost a skupenství

▼M3

(14) (18). Tyto srovnávací látky představují minimální počet látek, které by se měly používat k hodnocení přesnosti a spolehlivosti navrhované podobné nebo modifikované metody, ale neměly by se používat k vývoji nových metod. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze použít jiné chemické látky, u nichž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o jejich použití *in vivo*, přičemž je třeba vybírat především z chemických látek použitých v rámci optimalizační fáze, která následovala po prevalidaci, nebo ve validační studii VRM. Je-li to žádoucí, lze minimální seznam srovnávacích látek rozšířit o další látky zastupující jiné třídy chemických látek, u nichž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo*, za účelem dalšího hodnocení přesnosti navrhované metody.

Tabulka 1

Minimální seznam srovnávacích látek ke stanovení hodnot přesnosti a spolehlivosti podobných nebo modifikovaných metod zkoušení kožní dráždivosti za použití rekonstruované lidské epidermis ([1])

Chemická látka	Číslo CAS	Skupenství	Skóre *in vivo*	Kat. VRM *in vitro*	Kat. *in vivo* podle GHS OSN/CLP Evropské unie
1-brom-4-chlorbutan	6940-78-9	kapalné	0	Kat. 2	Bez kategorie
diethyl-ftalát	84-66-2	kapalné	0	Bez kategorie	Bez kategorie
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	pevné	0	Bez kategorie	Bez kategorie
allyl-fenoxyacetát	7493-74-5	kapalné	0,3	Bez kategorie	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	kapalné	0,3	Bez kategorie	Bez kategorie
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	kapalné	1	Kat. 2	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	pevné	1	Bez kategorie	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	kapalné	1,7	Bez kategorie	Bez kategorie
hexyl-salicylát	6259-76-3	kapalné	2	Bez kategorie	Bez kategorie
cinnamaldehyd	104-55-2	kapalné	2	Kat. 2	Bez kategorie (*Volitelná kat. 3*) ([3])
dekan-1-ol ([2])	*112-30-1*	*kapalné*	*2,3*	*Kat. 2*	*Kat. 2*
cyklamenaldehyd	103-95-7	kapalné	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	kapalné	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-(chlormethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-hydrochlorid	86604-75-3	pevné	2,7	Kat. 2	Kat. 2
dipropyldisulfid ([2])	*629-19-6*	*kapalné*	*3*	*Bez kategorie*	*Kat. 2*
hydroxid sodný (5 % vod.)	1310-58-3	kapalné	3	Kat. 2	Kat. 2
benzenthiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	kapalné	3,3	Kat. 2	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	pevné	3,3	Kat. 2	Kat. 2

▼M3

Chemická látka	Číslo CAS	Skupenství	Skóre *in vivo*	Kat. VRM *in vitro*	Kat. *in vivo* podle GHS OSN/CLP Evropské unie
heptanal	111-71-7	kapalné	3,4	Kat. 2	Kat. 2
tetrachlorethen	127-18-4	kapalné	4	Kat. 2	Kat. 2

([1]) Výběr chemických látek je založen na těchto kritériích: i) látky jsou dostupné na trhu, ii) jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky), iii) mají jasně definovanou chemickou strukturu, iv) jsou představitelem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu a v) nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (jako jsou např. karcinogenní látky nebo látky toxické pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.
([2]) Chemické látky, které jsou dráždivé pro králíky, ale u nichž existují spolehlivé důkazy o tom, že jsou nedráždivé pro lidi (31) (32) (33).
([3]) V rámci systému GHS OSN, nikoli podle nařízení CLP Evropské unie.

III. **Definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti**

8. Pro účely stanovení spolehlivosti a relevantnosti navrhovaných podobných nebo modifikovaných metod, jež se mají přenášet mezi laboratořemi, by mělo být všech 20 srovnávacích látek uvedených v tabulce 1 odzkoušeno nejméně třemi laboratořemi. Pokud se však má navrhovaná metoda používat jen v jedné laboratoři, nebude zkoušení ve více laboratořích v rámci validace nutné. Je však nezbytné, aby byly tyto validační studie samostatně vyhodnoceny mezinárodně uznávanými validačními orgány v souladu s mezinárodními směrnicemi (9). V každé laboratoři by se mělo odzkoušet všech 20 srovnávacích látek ve třech samostatných provedeních zkoušky vykonaných za použití různých šarží tkáně a s dostatečným časovým odstupem. Při každém provedení zkoušky by se měl použít nejméně tři souběžně zkoušené tkáňové replikáty pro každou zkoušenou látku, negativní kontrolu a pozitivní kontrolu.

9. Hodnoty spolehlivosti a přesnosti navrhované metody by se měly vypočítat s ohledem na všechna čtyři níže uvedená kritéria dohromady, přičemž je třeba zajistit, aby se hodnoty spolehlivosti a relevantnosti vypočítávaly předem vymezeným, jednotným způsobem:

   1) K výpočtu variability a prediktivní schopnosti (přesnosti) metody v rámci jedné laboratoře i v rámci různých laboratoří lze použít pouze údaje z takových provedení zkoušky, která jsou součástí úplné série provedení.

   2) Konečné zatřídění každé srovnávací látky v každé zúčastněné laboratoři by mělo vycházet z průměrné hodnoty životaschopnosti buněk v rámci různých provedení zkoušky, která jsou součástí úplné série provedení.

   3) K výpočtu mezilaboratorní variability metody lze použít pouze údaje získané pro chemické látky, které byly podrobeny úplné sérii provedení zkoušky ve všech zúčastněných laboratořích.

   4) Hodnoty přesnosti by se měly vypočítat na základě jednotlivých laboratorních predikcí získaných u 20 srovnávacích látek jednotlivými zúčastněnými laboratořemi.

   V této souvislosti se **série provedení** skládá ze tří samostatných provedení zkoušky v jedné laboratoři za použití jedné zkoušené látky. **Úplnou sérií provedení** se rozumí série provedení zkoušky v jedné laboratoři za použití jedné zkoušené látky, kdy všechna tři provedení jsou platná. To znamená, že jakékoli neplatné provedení způsobí neplatnost celé série tří provedení.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

10. Hodnocení vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti by mělo ukázat 90 % nebo vyšší (≥) shodu zatřídění jednotlivých látek (do kategorie 2 v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie, respektive mezi látky s označením „Bez kategorie“), k nimž se dospělo při různých nezávislých provedeních zkoušek 20 srovnávacích látek v rámci jediné laboratoře.

▼M3

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

11. Hodnocení mezilaboratorní reprodukovatelnosti není zásadně důležité, jestliže se má navrhovaná metoda používat pouze v jediné laboratoři. U metod, které se mají přenášet mezi laboratořemi, by shoda zatřídění jednotlivých látek (do kategorie 2 v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie, respektive mezi látky s označením „Bez kategorie“), k nimž se dospělo při různých nezávislých provedeních zkoušek 20 srovnávacích látek v rámci nejlépe alespoň tří laboratoří, měla být rovna nebo vyšší (≥) než 80 %.

Prediktivní schopnost (přesnost)

12. Přesnost (citlivosti, specifičnost a celková přesnost) navrhované podobné nebo modifikované metody by měla být srovnatelná nebo lepší než u VRM s přihlédnutím k dalším informacím týkajícím se relevantnosti u biologického druhu, který je předmětem zájmu (Tabulka 2). Citlivost by měla být rovna nebo vyšší (≥) než 80 % (2) (8) (23). Avšak další zvláštní omezení se týká citlivosti navrhované metody *in vitro*, kdy pouze dvě chemické látky patřící v rámci zkoušek *in vivo* do kategorie 2 (*dekan-1-ol* a *dipropyldisulfid*) mohou být více než jednou zúčastněnou laboratoří nesprávně zatříděny mezi látky „Bez kategorie“. Specifičnost by měla být rovna nebo vyšší (≥) než 70 % (2) (8) (23). Nejsou stanovena žádná další omezení, pokud jde o specifičnost navrhované metody *in vitro*, tzn. že kterákoli ze zúčastněných laboratoří může nesprávně zatřídit jakékoli látky patřící v rámci zkoušek *in vivo* mezi látky „Bez kategorie“, jestliže výsledná hodnota specifičnosti zkušební metody je v přijatelném rozsahu. Celková přesnost by měla být rovna nebo vyšší (≥) než 75 % (2) (8) (23). Ačkoli citlivost VRM vypočtená pro 20 srovnávacích látek uvedených v tabulce 1 činí 90 %, definovaná minimální hodnota citlivosti požadovaná u jakékoli podobné nebo modifikované metody, která má být považována za platnou, je stanovena na 80 %, jelikož je známo, že jak *dekan-1-ol* (hraniční látka), tak *dipropyldisulfid* (falešně negativní látka při použití VRM) nepůsobí u lidí dráždivě (31) (32) (33), ačkoli při zkoušce na králících byly identifikovány jakožto dráždivé látky. Jelikož jsou modely rekonstruované lidské epidermis založeny na buňkách lidského původu, mohou u těchto chemických látek predikovat, že se jedná o nedráždivé látky (označené v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“).

Tabulka 2

Prediktivní hodnoty citlivosti, specifičnosti a celkové přesnosti podobné nebo upravené metody nezbytné k tomu, aby byla metoda považována za platnou

Citlivost	Specifičnost	Celková přesnost
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kritéria přijatelnosti studie

13. Může se stát, že jedna nebo několik zkoušek týkajících se jedné nebo více zkoušených látek nesplňují kritéria přijatelnosti pro zkoušené a kontrolní látky a/nebo nejsou přijatelné z jiných důvodů. Za účelem doplnění chybějících údajů je přípustné pro každou zkoušenou látku provést nejvýše dvě doplňkové zkoušky („přezkoušení“). Přesněji řečeno, jelikož v případě přezkoušení je nutno souběžně provést i zkoušky pozitivních a negativních kontrol, pro každou zkoušenou látku je možno uskutečnit nejvýše dvě doplňková provedení zkoušky.

14. Je možné, že se ani po přezkoušení nepodaří získat minimální počet tři platných provedení zkoušky pro každou srovnávací látku v každé zúčastněné laboratoři, což vede ke vzniku neúplné matice údajů. V takových případech by měla být splněna všechna tři následující kritéria, aby byly soubory údajů považovány za přijatelné:

    1) Všech 20 srovnávacích látek by mělo mít alespoň jednu úplnou sérii provedení zkoušky.

▼**M3**

2) V každé z nejméně tří zúčastněných laboratoří musí být dokončeno nejméně 85 % úplných sérií provedení zkoušky (pro 20 chemických látek, tzn. že v jedné laboratoři jsou povoleny nejvýše 3 neplatné série provedení zkoušky).

3) Nejméně 90 % všech možných sérií provedení zkoušky z nejméně tří laboratoří musí být úplných (pro 20 chemických látek zkoušených ve 3 laboratořích, tzn. že celkem je povoleno 6 neplatných sérií provedení zkoušky).

▼M2

B. 47 ZKUŠEBNÍ METODA PRO ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY U SKOTU PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI

ÚVOD

1. Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP – Bovine Corneal Opacity and Permeability) je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními použít pro klasifikaci látek a směsí jako „látky s leptavými a silně dráždivými účinky na oči“ (1) (2) (3). Pro účely této zkušební metody jsou silné dráždivé látky definovány jako látky způsobující oční léze, které přetrvávají u králíků po dobu nejméně 21 dní po jejich podání. I když se BCOP nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se použít jako součást strategie stupňovitých zkoušek pro regulační klasifikaci a označování v rámci specifické oblasti použitelnosti (4) (5). Zkoušené látky a směsi (6) lze klasifikovat jako látky s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči bez dalšího zkoušení na králících. Látka, jejíž negativní zkoušky by si vyžádaly zkoušení na králících s použitím strategie stupňovitého zkoušení, jak je uvedeno v metodice OECD 405 (7) (kapitola B. 5 této přílohy).

2. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních leptavých nebo silně dráždivých účinků zkoušené látky na oči měřené její schopností způsobit zákal a zvýšit propustnost v oddělené rohovce skotu. Toxické účinky na rohovku se měří: i) sníženou propustností světla (zákal) a ii) zvýšenou prostupností barviva fluoresceinu sodného (propustnost). Hodnocení zákalu a propustnosti rohovky po expozici zkoušené látce se spojí, aby se odvodil stav podrážděnosti *in vitro* (IVIS – *In Vitro* Irritancy Score), který se používá pro klasifikaci úrovně dráždivých účinků zkoušené látky.

3. Látky s dráždivými účinky na oči způsobující léze, které odezní nejpozději do 21 dní a nedráždivé látky byly rovněž zkoušeny s použitím zkušební metody BCOP. Přesnost a spolehlivost zkušební metody BCOP u látek těchto kategorií však nebyla oficiálně hodnocena.

4. Definice jsou uvedeny v dodatku l.

POČÁTEČNÍ POSOUZENÍ A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu zkušební metody BCOP Koordinačního výboru mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) (8) zpracovaném v návaznosti na mezinárodní studii o ověřování platnosti (4)(5)(9) s přispěním Evropského střediska pro validaci alternativních metod (ECVAM) a Japonského střediska pro validaci alternativních metod (JaCVAM). Protokol vychází z informací získaných z Institutu pro vědní obor *in vitro* (IIVS) a z protokolu 124 INVITTOX (10), který představuje protokol používaný pro studii o předběžném ověřování platnosti analýzy BCOP sponzorovanou Evropským společenstvím a vypracovanou v letech 1997–1998. Oba tyto protokoly jsou založeny na metodice analýzy BCOP poprvé ohlášené Gautheronem *et al.* (11).

▼M2

6. Stanovená omezení pro tuto zkušební metodu jsou založena na vysokých mírách falešné pozitivity pro alkoholy a ketony a na vysoké míře falešné negativity pro pevné látky sledované v databázi ověřování platnosti (viz bod 44) (5). Jsou-li látky v rámci těchto chemických a fyzikálních tříd vyřazeny z databáze, přesnost BCOP v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS je podstatně vyšší (5). Vycházeje z účelu této analýzy (tj. zjišťovat pouze látky s leptavými/silně dráždivými účinky na oči), míry falešné negativity nejsou kritické, protože tyto látky by se následně zkoušely na králících nebo jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* v závislosti na požadavcích právních předpisů s využitím strategie stupňovitého zkoušení v přístupu založeném na vážení důkazů. Kromě toho současná databáze ověřování platnosti neumožňuje odpovídající hodnocení některých tříd chemických látek nebo produktů (např. směsí). Výzkumníci by však mohli zvážit použití této zkušební metody pro všechny druhy zkoušených látek (včetně směsí), přičemž kladné výsledky by mohly být přijaty jako indikátor reakce očí na leptavé nebo silně dráždivé látky. Kladné výsledky získané u alkoholů a ketonů by se však měly interpretovat opatrně z důvodu rizika nepřiměřené předpovědi.

7. V případě všech postupů týkajících se očí skotu a rohovek skotu by se měla dodržovat nařízení a postupy použitelné na zkušebny pro zacházení s materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáně a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (12).

8. Omezení zkušební metody spočívá v tom, že i když tato metoda přihlíží k některým účinkům na oči vyhodnoceným zkušební metodou podráždění očí králíků a do určité míry i k jejich síle, nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky. A také ačkoli reverzibilitu lézí rohovky nelze v analýze BCOP hodnotit samu o sobě, na základě studií prováděných na očích králíků bylo navrženo, aby se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky použilo k rozlišení mezi nevratnými a vratnými účinky (13). A konečně je třeba uvést, že BCOP neumožňuje posouzení možnosti soustavné toxicity spojené s expozicí očí určitým látkám.

9. Vyvíjí se úsilí, aby se dále popsala účelnost a omezení analýzy BCOP pro zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek (viz také bod 45). Uživatelům se rovněž doporučuje, aby organizacím pro ověřování platnosti poskytli vzorky a/nebo údaje pro oficiální hodnocení případného budoucího použití zkušební metody BCOP, včetně zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek.

10. Každá laboratoř, která poprvé provádí tuto analýzu, by měla použít vhodné chemické látky uvedené v dodatku 2. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti v provádění zkušební metody BCOP před předložením analytických údajů BCOP pro regulační účely klasifikace nebezpečnosti.

ZÁSADA ZKOUŠKY

11. Zkušební metoda BCOP je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé udržování běžné fyziologické a biochemické funkce rohovky skotu *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou látkou posuzuje kvantitativním měřením změn v zákalu a propustnosti rohovky za pomoci opacitometru (přístroje na měření průhlednosti) a optického lehkého spektrofotometru. Obě měření se používají k výpočtu stavu podráždění *in vitro* (IVIS) za účelem přidělení kategorie klasifikace nebezpečnosti podráždění pro předpovídání potenciálu očního podráždění zkoušenou látkou *in vivo* (viz kritéria rozhodování).

▼M2

12. Zkušební metoda BCOP používá oddělené rohovky z očí čerstvě poraženého skotu. Zákal rohovky se měří kvantitativně jako množství průchodu světla rohovkou. Propustnost se měří kvantitativně jako množství barviva fluoresceinu sodného, které prochází celou tloušťkou rohovky a zjišťuje se v mediu zadní komory. Zkoušené látky se aplikují na epiteliální povrch rohovky přidáním do přední komory držáku rohovky. V dodatku 3 je uveden popis a schématický nákres držáku rohovky používaný v BCOP. Držáky rohovky lze komerčně získat z různých zdrojů, nebo je lze zkonstruovat.

Zdroj a věk očí skotu a výběr druhů zvířat

13. Skot posílaný na jatka se zpravidla poráží buď pro lidskou spotřebu, nebo pro jiná komerční použití. Jako zdroj rohovek pro použití v BCOP se používají pouze zdravá zvířata, která se považují za vhodná pro vstup do lidského potravinového řetězce. Jelikož skot má široký rozsah hmotnosti v závislosti na chovu, věku a pohlaví, neexistuje žádné doporučení týkající se hmotnosti zvířat v době porážky.

14. Mohou se vyskytnout rozdíly ve velikosti rohovky, když se používají oči od zvířat různého věku. Rohovky o vodorovném průměru > 30,5 mm a s hodnotami základní tloušťky rohovky (CCT) ≥ 1 100 μm se obvykle získávají ze skotu staršího osmi let, zatímco rohovky o vodorovném průměru < 28,5 mm a CCT < 900 μm se obvykle získávají ze skotu mladšího pěti let (14). Z těchto důvodů se zpravidla nepoužívají oči ze skotu staršího 60 měsíců. Oči ze skotu mladšího 12 měsíců se tradičně nepoužívají, protože oči se ještě vyvíjejí a tloušťka a průměr rohovky jsou mnohem menší, než jsou zaznamenány u očí dospělého skotu. Používání rohovek z mladých zvířat (tj. 6 až 12 měsíců starých) je však přípustné, jelikož mají určité výhody, např. zvýšená dostupnost, úzký věkový rozsah a nižší nebezpečnost související s potenciální expozicí zaměstnanců bovinní spongiformní encefalopatii (15). Protože by bylo účelné další hodnocení vlivu velikosti nebo tloušťky rohovky na reakci na leptavé a dráždivé látky, uživatelům se doporučuje oznamovat odhadovaný věk a/nebo hmotnost zvířat, které poskytují rohovky používané ve studii.

Získávání a doprava očí do laboratoře

15. Oči shromažďují zaměstnanci jatek. Aby se minimalizovaly mechanické a jiné druhy poškození očí, měly by se oči odstranit co nejdříve po úmrtí. Aby se zamezilo expozici očí potenciálně dráždivým látkám, zaměstnanci jatek by neměli při oplachování hlavy zvířete používat čistící prostředky.

16. Oči by měly být ve vhodně velké nádobě úplně ponořeny do Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) a dopraveny do laboratoře tak, aby se minimalizovalo poškození a/nebo bakteriální znečištění. Jelikož oči se získávají během procesu porážení, mohou být vystaveny krvi a jiným biologickým látkám, včetně baktérií a jiných mikroorganismů. Proto je důležité zajistit, aby riziko znečištění bylo minimalizováno (např. držením nádoby, která obsahuje oči, v mokrém ledu, přidáním antibiotik do Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) použitého k uchování očí během dopravy [např. penicilín se 100 m.j./ml a streptomycin se 100 μg/ml]).

▼M2

17. Časový interval mezi získáním očí a použitím rohovky v BCOP by měl být co nejkratší (získání a použití se uskutečňuje zpravidla tentýž den) a měl by být prokázán, aby se nenarušily výsledky analýzy. Tyto výsledky jsou založeny na kritériích výběru očí a také na reakcích na pozitivní a negativní kontroly. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí získaných v určitý den.

Kritéria výběru očí používaných v BCOP

18. Jakmile se oči dostanou do laboratoře, jsou pečlivě vyšetřeny z hlediska vad, včetně zvýšeného zákalu, škrábanců a neovaskularizace. Smějí se používat pouze rohovky z očí, které tyto vady nemají.

19. Kvalita každé rohovky se také hodnotí v pozdějších krocích analýzy. Rohovky, které mají zákal větší než sedm zákalových jednotek, se po počáteční jednohodinové době vyrovnání vyřadí (POZNÁMKA: opacitometr by měl být kalibrován podle norem zákalu používaných k určení zákalových jednotek, viz dodatek 3).

20. Každá zkušební skupina (zkoušená látka, paralelní negativní a pozitivní kontroly) pozůstává nejméně ze třech očí. V případě rohovek pro negativní kontrolu by se v analýze BCOP měly používat tři rohovky. Protože všechny rohovky jsou vyříznuty z celé oční boule a vloženy do komor rohovky, existuje možnost výtvorů ze zpracování jednotlivých hodnot zákalu a propustnosti rohovky (včetně negativní kontroly). Kromě toho se hodnoty zákalu a propustnosti rohovek z negativních kontrol používají k úpravě zkoušených předmětů a hodnoty zákalu a propustnosti rohovek z pozitivních kontrol se používají ve výpočtech IVIS.

POSTUP

Příprava očí

21. Rohovky, které nemají vady, se vyřezávají s 2 až 3 mm okrajem očního bělma, který zůstává a pomáhá v následném ošetření, přičemž se musí dávat pozor, aby se zamezilo poškození epitelu a endotelu rohovky. Oddělené rohovky se zasazují do zvlášť k tomu určených držáků rohovek složených z předních a zadních částí, které se dotýkají příslušně epiteliálních a endoteliálních stran rohovky. Obě komory se úplně zaplní předehřátým Eaglovým minimálně nutným médiem (EMEM) (nejdříve zadní komora) a tím se zajistí, že se nevytvoří žádné bubliny. Zařízení se potom vyrovnává na teplotu 32 ± 1 °C nejméně po dobu jedné hodiny, aby se rohovky mohly srovnat s médiem a dosáhnout v co největším rozsahu běžné metabolické aktivity (přibližná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32 °C).

22. Po době vyrovnání se čerstvé předehřáté médium EMEM přidá do obou komor a pro každou rohovku se odeberou základní údaje o zákalu. Všechny rohovky, které vykazují makroskopické poškození tkání (např. poškrábání, pigmentace, neovaskularizace) nebo zákal > 7 jednotek zákalu, se vyřadí. Vypočte se střední zákal vyrovnaných rohovek. Minimálně tři rohovky s hodnotami zákalu, které se blíží střední hodnotě všech rohovek, se vyberou jako rohovky pro negativní kontrolu (nebo pro kontrolu s rozpouštědlem). Zbylé rohovky se potom rozdělí do zkušebních skupin a do skupin pro pozitivní kontrolu.

▼M2

23. Jelikož tepelná kapacita vody je ve srovnání se vzduchem vyšší, voda poskytuje stabilnější teplotní podmínky pro inkubaci. Proto se doporučuje používání vodní lázně pro udržování držáku rohovky a jeho obsahu při teplotě 32 ± 1 °C. Vzduchové inkubátory však lze také použít za předpokladu, že budou přijata preventivní opatření k zachování tepelné stability (např. předehřátím držáků a medií).

Aplikace zkoušené látky

24. Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro tekutiny a smáčedla (pevné nebo tekuté) a jeden pro pevné látky, které nejsou smáčedla.

25. Tekutiny se zkoušejí neředěné, zatímco smáčedla se zkoušejí při koncentraci 10 % objemové hmotnosti (w/v) v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. Jako tekutiny se zpravidla zkoušejí polotuhé, krémové a voskovité látky. U alternativních koncentrací roztoku by mělo být předloženo příslušné zdůvodnění. Rohovky jsou vystaveny tekutinám a smáčedlům po dobu 10 minut. Použití jiných dob expozice by mělo být doprovázeno odpovídajícím vědeckým zdůvodněním.

26. Pevné látky, které nejsou smáčedla, se zpravidla zkoušejí jako roztoky nebo suspenze při 20 % koncentraci v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. Za určitých okolností a s náležitým vědeckým zdůvodněním se pevné látky mohou zkoušet také čisté s přímou aplikací na povrch rohovky a s použitím metody otevřených komor (viz bod 29). Rohovky jsou vystaveny pevným látkám po dobu čtyř hodin, ale podobně jako u tekutých látek a smáčedel lze s odpovídajícím vědeckým zdůvodněním použít alternativní doby expozice.

27. Je možné použít různé metody zkoušení v závislosti na fyzické povaze a chemických vlastnostech zkoušené látky (např. pevné látky, tekutiny, viskózní látky versus neviskózní tekutiny). Kritický faktor zajišťuje, že zkoušená látka náležitě pokrývá epiteliální povrch a že je příslušně odstraněna během oplachování. Metoda uzavřených komor se obvykle používá pro neviskózní až mírně viskózní tekuté zkoušené látky, zatímco metoda otevřených komor se zpravidla používá pro poloviskózní a viskózní tekuté zkoušené látky a pro čisté pevné látky.

28. V metodě uzavřených komor se dostatečné množství zkoušené látky (750 μL) k pokrytí epiteliální strany rohovky zavádí do přední komory přes dávkovací otvory na horním povrchu komory a otvory jsou potom během expozice uzavřeny komorovými zátkami. Je důležité zajistit, aby každá rohovka byla vystavena zkoušené látce po příslušnou dobu.

29. V metodě otevřených komor se před zkoušením odstraní z přední komory zavírací klička okénka a skleněné okénko. Kontrolní nebo zkoušená látka (750 μL nebo dostatečné množství zkoušené látky, aby úplně pokryla rohovku) se aplikuje přímo na epiteliální povrch rohovky s použitím mikropipety. Pokud je zkoušenou látku obtížné pipetovat, lze ji zavést pod tlakem do objemové pipety, což pomůže v dávkování. Špička objemové pipety se zasune do dávkovací špičky injekční stříkačky tak, aby látku bylo možné zavést pod tlakem do špičky vytěsňování. Píst injekční stříkačky se stlačí současně s tím, jak se píst pipety vytahuje nahoru. Pokud se ve špičce pipety objeví vzduchové bubliny, zkoušený předmět se odstraní (vytlačí) a postup se opakuje, dokud špička není naplněná bez vzduchových bublin. V případě potřeby lze použít běžnou injekční stříkačku (bez jehly), protože umožňuje měření přesného objemu zkoušené látky a snadnější aplikaci na epiteliální povrch rohovky. Po dávkování se skleněné okénko umístí znovu na přední komoru, aby se obnovil uzavřený systém.

▼M2

Inkubace po expozici

30. Po době expozice se zkoušená látka, látka pro negativní kontrolu nebo látka pro pozitivní kontrolu odstraní z přední komory a epitel se nejméně třikrát opláchne (nebo se oplachuje tak dlouho, dokud nepřestanou být viditelné stopy zkoušené látky) médiem EMEM (obsahující fenolovou červeň). Na oplachování se používá médium obsahující fenolovou červeň, protože změnu barvy ve fenolové červeni lze sledovat, aby se zjistila účinnost oplachovacích kyselých nebo alkalických látek. Rohovky se proplachují více než třikrát, pokud je fenolová červeň ještě zbarvená (do žluta nebo do nachova), nebo pokud je zkoušená látka stále viditelná. Jakmile již v médiu není zkoušená látka, rohovky se naposledy opláchnou médiem EMEM (bez fenolové červeně). EMEM (bez fenolové červeně) se používá jako konečný oplach, aby se před měřením zákalu zajistilo odstranění fenolové červeně z přední komory. Přední komora se pak naplní čerstvým EMEM bez fenolové červeně.

31. U tekutin nebo smáčedel se rohovky po oplachu inkubují po dobu dalších dvou hodin při teplotě 32 ± 1 °C. Delší doba po expozici by byla za určitých okolností účelná a mohla by se zvážit případ od případu. Rohovky zkoušené s pevnými látkami se důkladně propláchnou na konci doby čtyřhodinové expozice, ale nevyžadují si další inkubaci.

32. Zákal a propustnost každé rohovky se v případě tekutých látek a smáčedel zaznamená na konci doby inkubace po expozici a v případě pevných látek, které nejsou smáčedla, na konci doby čtyřhodinové expozice. Každá rohovka se sleduje rovněž vizuálně a případná pozorování se zaznamenají (např. odlupování tkáně, zbytky zkoušené látky, nejednotné struktury rohovky). Tato pozorování by mohla být důležitá, protože mohou odrážet změny v údajích opacitometru.

Látky pro kontrolu

33. Do každého pokusu se zařazují souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.

34. Když se zkouší tekutá látka při 100 % koncentraci, souběžná negativní kontrola (např. 0,9 % roztok chloridu sodného nebo destilovaná voda) se zahrne do zkušební metody BCOP tak, aby bylo možné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základnu pro koncové body analýzy. Tím se rovněž zajistí, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.

35. Když se zkouší rozředěná tekutina, smáčedlo nebo pevná látka, skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem se zahrne do zkušební metody BCOP tak, aby bylo možné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základnu pro koncové body analýzy. Lze použít pouze rozpouštědlo/vehikul, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.

36. Do každého pokusu se zařadí známá látka s dráždivými účinky na oči jako látka pro souběžnou pozitivní kontrolu, aby se ověřilo, že je vyvolána odpovídající reakce. Protože analýza BCOP se v této zkušební metodě používá ke zjišťování leptavých nebo silných dráždivých látek, ideálně by pro pozitivní kontrolu měla být referenční látka, která v této zkušební metodě vyvolá silnou reakci. Aby se však zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah dráždivé reakce by neměl být nadměrný.

37. Příklady tekutých zkoušených látek pro pozitivní kontrolu jsou dimetylformamid nebo 1 % hydroxid sodný. Příkladem pevných zkoušených látek pro pozitivní kontrolu je 20 % (objemové hmotnosti) imidazol v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

▼M2

38. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek či produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativního podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové body

39. Zákal se určuje množstvím světelné propustnosti rohovkou. Zákal rohovky se kvantitativně měří za pomoci opacitometru a výsledkem jsou hodnoty zákalu měřené na celém rozsahu stupnice.

40. Propustnost se určuje množstvím barviva fluoresceinu sodného, které proniká všemi vrstvami buněk rohovky (tj. epitelem na vnějším povrchu rohovky přes endotel na vnitřním povrchu rohovky). 1 ml roztoku fluoresceinu sodného (4 nebo 5 mg/ml, když se příslušně zkoušejí tekuté látky a smáčedla nebo pevné látky, které nejsou smáčedla) se přidává do přední komory držáku rohovky, která je spojena s epiteliální stranou rohovky, zatímco zadní komora, která je spojena s endoteliální stranou rohovky, se naplní čerstvým médiem EMEM. Držák se potom ve vodorovné poloze inkubuje po dobu 90 ± 5 min. na teplotu 32 ± 1 °C. Množství fluoresceinu sodného, který přechází do zadní komory, se kvantitativně měří za pomoci spektrofotometrie UV/VIS. Spektrofotometrická měření hodnocená ve 490 nm se zaznamenají jako optická hustota (OD_{490}) nebo hodnoty absorbance, které se měří na celém rozsahu stupnice. Hodnoty propustnosti fluoresceinu se stanoví s použitím hodnot OD_{490} na základě spektrofotometru viditelného světla s použitím běžné optické délky 1 cm.

41. Alternativně se může použít analyzátor destiček s 96 jamkami, pokud i) lze stanovit lineární dosah analyzátoru destiček pro určení hodnot fluoresceinu OD_{490}; a ii) v 96jamkové destičce je použito správné množství vzorků fluoresceinu, jehož výsledkem jsou hodnoty OD_{490} odpovídající běžné optické délce 1 cm (to by si mohlo vyžadovat úplně plnou jamku [obvykle 360μL]).

ÚDAJE A PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení údajů

42. Jakmile se hodnoty zákalu a střední hodnoty propustnosti (OD_{490}) upraví na zákal pozadí a hodnoty propustnosti OD_{490} pro negativní kontrolu, střední hodnoty zákalu a propustnosti OD_{490} pro každou zkušební skupinu by se měly spojit do empiricky odvozeného vzorce, aby se vypočítal stav podráždění *in vitro* (IVIS) pro každou zkušební skupinu takto:

IVIS = střední hodnota zákalu + (15 × střední hodnota propustnosti OD_{490})

Sina *et al.* (16) oznámil, že tento vzorec byl odvozen během laboratorních a mezilaboratorních studií. Údaje vytvořené pro řady 36 sloučenin v multilaboratorní studii byly předmětem vícerozměrné analýzy s cílem určit nejvhodnější rovnováhu mezi údaji *in vivo* a *in vitro*. Tuto analýzu uskutečnili ve dvou samostatných společnostech vědci, kteří odvodili téměř stejné vzorce.

43. Hodnoty zákalu a propustnosti by se měly rovněž posuzovat samostatně, aby se určilo, zda zkoušená látka způsobuje poleptání nebo silné podráždění pomocí pouze jednoho nebo dvou koncových bodů (viz kritéria rozhodování).

▼M2

Kritéria rozhodování

44. Látka, která způsobuje IVIS ≥ 55,1, se definuje jako leptavá nebo silně dráždivá. Jak je uvedeno v bodě 1, pokud zkoušená látka není určena jako látka s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči, mělo by se uskutečnit další zkoušení pro účely klasifikace a označování. Zkušební metoda BCOP má celkovou přesnost 79 % (113/143) až 81 % (119/147), míru falešné pozitivity 19 % (20/103) až 21 % (22/103) a míru falešné negativity 16 % (7/43) až 25 % (10/40) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle klasifikačních systémů EPA (1), EU (2) nebo GHS (3). V případě, že látky v určitých chemických třídách (tj. alkoholy, ketony) nebo fyzikálních třídách (tj. pevné látky) jsou vyloučeny z databáze, přesnost BCOP se v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS pohybuje v rozmezí od 87 % (72/83) do 92 % (78/85), míra falešné pozitivity od 12 % (7/58) do 16 % (9/56) a míra falešné negativity od 0 % (0/27) do 12 % (3/26).

45. I když se klasifikace látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči pro zkoušenou látku nezíská, údaje BCOP mohou být užitečné ve spojení s testovacími údaji z oční zkoušky *in vivo* na králících nebo z náležitě validované zkoušky *in vitro*, aby se dále vyhodnotila účelnost a omezení zkušební metody BCOP pro určení slabých dráždivých a nedráždivých látek (dokument s pokyny o používání zkušebních metod oční toxicity *in vitro* se zpracovává).

Kritéria přijetí studie

46. Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud pozitivní kontrola vykazuje IVIS spadající do obvyklých odchylek dosavadní střední hodnoty, kterou je třeba aktualizovat nejméně každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Výsledkem reakce na negativní kontrolu nebo na kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem by měly být hodnoty zákalu a propustnosti, které jsou nižší než stanovené horní meze pro hodnoty zákalu pozadí a prostupnosti u rohovek skotu zkoušené příslušnou negativní kontrolou nebo kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem.

Zpráva o zkoušce

47. Zpráva o zkoušce by měla zahrnovat tyto informace, pokud se týkají uskutečňování studie:

Zkoušené látky a látky pro kontrolu

Chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný službou chemických abstrakt (CAS) spolu s dalšími názvy, jsou-li známy;

registrační číslo (RN) CAS, je-li známo;

čistota a složení látky nebo směsi (v procentu (procentech) podle váhy), jsou-li tyto informace dostupné;

fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stálost, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie;

případně ošetření zkoušené látky/látky pro kontrolu před zkoušením (např. zahřátí, mletí);

stálost, je-li známa.

▼M2

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie;

určení zdroje očí (tj. zařízení, z něhož byly získány);

podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas získání očí, časový interval před zahájením zkoušení, dopravní prostředky a teplotní podmínky dopravy, všechna použitá antibiotika);

specifické vlastnosti zvířat, z nichž byly získány oči, jsou-li tyto vlastnosti k dispozici (např. věk, pohlaví, hmotnost zvířete, které je dárcem).

Zdůvodnění použité zkušební metody a protokolu

Úplnost zkušební metody

Postup používaný k zajištění úplnosti (tj. přesnosti a spolehlivosti) zkušební metody v průběhu času (např. pravidelné zkoušení vhodných látek, využívání dosavadních údajů negativních a pozitivních kontrol).

Kritéria pro přijatelnou zkoušku

Přijatelné rozsahy souběžných pozitivních a negativních kontrol založené na dosavadních údajích;

případně přijatelné rozsahy souběžných srovnávacích kontrol na základě dosavadních údajů.

Zkušební podmínky

Popis použitého zkušebního systému;

typ použitého držáku rohovek;

informace o kalibraci přístroje použitého k měření zákalu a propustnosti (např. opacitometr a spektrofotometr);

informace o použitých rohovkách skotu, včetně prohlášení o jejich kvalitě;

podrobnosti o použitém zkušebním postupu;

koncentrace použité zkoušené látky;

popis všech změn zkušebního postupu;

odkaz na dosavadní údaje modelu (např. negativní a pozitivní kontroly, vhodné látky, srovnávací látky);

popis použitých hodnotících kritérií.

Výsledky

Sestavení údajů z jednotlivých zkušebních vzorků do tabulek (např. hodnoty zákalu OD_{490} a vypočítaný IVIS pro zkoušenou látku a pozitivní, negativní a srovnávací kontroly [jsou-li zahrnuty] uvedené v tabulkové formě, případně včetně údajů z několikrát opakovaných pokusů a středních hodnot ± běžné odchylky pro každý pokus);

popis jiných pozorovaných účinků.

Posouzení výsledků

Závěr

LITERATURA

1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2. vydání. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

2) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

3) OSN (2007). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC). Druhé revidované vydání, New York a Ženeva: publikace Organizace spojených národů, 2007. Dostupné na:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

4) ESAC (2007). Prohlášení o uzavření retrospektivní studie ICCVAM o orgánových analýzách *in vitro* jako screeningové testy pro zjišťování potenciálních látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči. Dostupné na:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

5) ICCVAM (2007). Zpráva o hodnocení zkušebních metod – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

6) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

7) OECD (2002). Metodika 405. Pokyn OECD pro zkoušení chemických látek. Akutní podráždění/poleptání očí. Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

8) ICCVAM (2007). Doporučený protokol zkušební metody BCOP ICCVAM. Ve: Zprávě o hodnocení zkušebních metod ICCVAM – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

9) ICCVAM. (2006). Současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu. Publikace NIH č.: 06-4512. Research Triangle Park: národní toxikologický program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].

10) INVITTOX (1999). Protokol 124: analýza zákalu a propustnosti rohovky skotu – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Itálie: Evropské středisko pro ověřování platnosti alternativních metod (ECVAM).

▼**M2**

11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health-care Settings. Dostupné na:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

17) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

18) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *In Vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼M2

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a očnici a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené látce. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky. Zákal lze hodnotit subjektivně, jak se to dělá ve Draizeově oční zkoušce na králících, nebo objektivně s přístrojem jako „opacitometr“.

Propustnost rohovky: Kvantitativní měření poškození epitelu rohovky určením množství barviva fluoresceinu sodného, který prochází všemi vrstvami buněk rohovky.

Kategorie 1 EPA: Zasažení leptavou látkou (nevratné poškození oční tkáně) nebo zasažení rohovky či podráždění přetrvávající déle než 21 dní (1).

Kategorie R41 EU: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzické slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (2).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): Systém klasifikace chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních rizik a odpovídajícího označování pomocí prvků informací o nebezpečnosti, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, aby poskytly informace o nepříznivých účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, dopravců, spotřebitelů a respondérů nebezpečí) a životního prostředí (3).

▼M2

Kategorie 1 GHS: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (3).

Nebezpečnost: Základní charakteristika chemické látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Stav podráždění *in vitro* (IVIS): Empiricky odvozený vzorec používaný v analýze BCOP, přičemž střední hodnoty zákalu a propustnosti se pro každou zkušební skupinu spojí do jedné hodnoty *in vitro* pro každou zkušební skupinu. *IVIS* = střední hodnota zákalu + (15 x střední hodnota propustnosti).

Negativní kontrola: Nezkoušená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Nedráždivá látka: Látky, které nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie I, II, nebo III EPA; kategorie R41 nebo R36 EU; nebo kategorie 1, 2A, nebo 2B GHS.

Látka s leptavými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratné poškození tkání oka; b) látky které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1) (2) (3).

Látka s dráždivými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratnou změnu v oku po aplikaci na přední plochu oka; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie II nebo III EPA, kategorie R36 EU nebo kategorie 2A nebo 2B GHS (1) (2) (3).

Látka se silně dráždivými účinky na oči: a) Látka způsobující poškození v oku po aplikaci na přední plochu oka, které neodezní do 21 dní po aplikaci, nebo způsobující závažné fyzikální slábnutí vidění; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU, (1) (2) (3).

Opacitometr: Přístroj používaný k měření „zákalu rohovky“ kvantitativním hodnocením světelné propustnosti přes rohovku. Typický přístroj má dvě části, každá s vlastním zdrojem světla a fotobuňkou. Jedna část se používá pro zkoušenou rohovku a druhá pro kalibraci a vynulování přístroje. Světlo z halogenové lampy se posílá přes kontrolní část (prázdná komora bez okének nebo tekutin) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které je umístěna komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuněk se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s látkou, o níž je známo, že vyvolává pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný.

▼M2

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikulu, který se zpracovává ošetřenou zkoušenou látkou a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků ošetřených zkoušenou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Stupňovité zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud lze potenciál dráždivých účinků zkoušené látky určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech, dokud se neurčí jednoznačná klasifikace.

Validovaná zkušební metoda: zkušební metoda, pro kterou byly zpracovány validační studie s cílem určit důležitost (včetně přesnosti) a spolehlivost pro specifický účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼M2

Dodatek 2

Vhodné látky pro zkušební metodu BCOP

Než laboratoře rutinně použijí zkušební metodu, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace 10 látek s dráždivými účinky na oči doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí v případě místního podráždění/poleptání očí, které vycházejí z výsledků očních zkoušek *in vivo* na králících (TG 405) (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo neklasifikované a označené podle GHS OSN) (3) (7). S přihlédnutím k validované účelnosti těchto analýz (tj. zjišťování pouze látek s leptavými/silně dráždivými účinky na oči) však existují pouze dva výsledky zkoušky pro klasifikační účely (leptavá/silně dráždivá látka nebo neleptavá/slabá dráždivá látka), aby byla prokázána odborná způsobilost. Dalším kritériem výběru bylo to, zda látka je komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou kvalitní údaje ze dvou metod *in vitro*, pro které byly zpracovány metodiky. Z tohoto důvodu byly dráždivé látky vybrány z doporučeného seznamu 122 referenčních látek ICCVAM pro ověření platnosti zkušebních metod oční toxicity *in vitro* (viz dodatek H: Doporučené referenční látky ICCVAM) (5). Referenční údaje jsou dostupné v základním dokumentu o přezkumu ICCVAM pro zkušební metodu BCOP a odděleného kuřecího oka (ICE) (17) (18).

Tabulka 1

Doporučené látky k prokázání odborné způsobilosti pro BCOP

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* ([2])	Klasifikace *in vitro* ([3])
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dibenzoyl-L–tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Kyselina trichloroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dichlorbenzoyl chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Tekutá	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Etyl-2-metylaceto–acetát	609-14-3	Keton, ester	Tekutá	Kategorie 2B	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka

▼**M2**

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* ([2])	Klasifikace *in vitro* ([3])
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/Slabá dráždivá látka
n-hexan	110-54-3	Uhlovodík (acyklický)	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka

Zkratky: CASRN = registrační číslo podle služby chemických abstrakt

([1]) Třídy chemických látek byly přiděleny každé zkoušené látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupné na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (OECD TG 405) s použitím GHS OSN (3)(7).

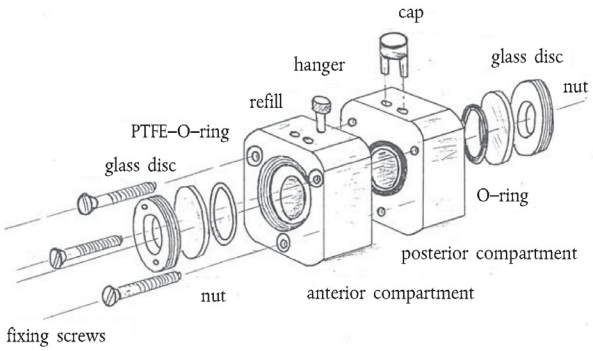
([3]) Založena na výsledcích v BCOP a ICE.

▼M2

Dodatek 3

DRŽÁK ROKOVEK BCOP

1. Držáky rohovek BCOP se vyrábějí z inertního materiálu (např. polypropylenu). Držáky se skládají ze dvou polovin (přední a zadní komora) a mají dvě podobné cylindrické vnitřní komory. Každá komora pojme obsah 5 ml a končí ve skleněném okénku, přes které se zaznamenávají měření zákalu. Každá vnitřní komora má průměr 1,7 cm a hloubku 2,2 cm ([1]). Použije se těsnící kroužek umístěný na zadní komoře, aby se zamezilo úniku látky. Rohovky jsou umístěny na endoteliální straně pod těsnícím kroužkem zadních komor a přední komory se nacházejí na epiteliální straně rohovek. Komory se udržují na místě za pomoci třech nerezavých šroubů umístěných na vnějších okrajích komory. Na konci každé komory se nachází skleněné okénko, které lze odstranit, aby byl snadný přístup k rohovce. Jeden těsnící kroužek je také umístěn mezi skleněným okénkem a komorou, aby se zamezilo úniku látky. Dva otvory v horní části každé komory umožňují zavedení a odstranění média a zkoušených směsí. Po dobu zkoušení a inkubace jsou uzavřeny gumovými uzávěry.



Glosář

Glass disc: Skleněná kruhová destička

PTFE-O-ring: Těsnicí kroužek z PTFE

Refill: Plnicí otvor

Hanger: Skoba

Cap: Krytka

Nut: Matice

O-ring: Těsnicí kroužek

Posterior compartment: Zadní komora

Anterior compartment: Přední komora

Fixing screws: Spojovací šrouby

([1]) Poskytnuté rozměry vycházejí z držáku rohovek, který se používá u krav ve věku od 12 do 60 měsíců. V případě, že se používají zvířata ve věku od 6 do 12 měsíců, držák by musel být zkonstruován tak, aby každá komora měla objem 4 ml a aby každá vnitřní komora měla průměr 1,5 cm a hloubku 2,2 cm. U každého nově zkonstruovaného držáku rohovek je velmi důležité, aby poměr exponované plochy povrchu rohovky k objemu zadní komory byl stejný jako poměr v tradičním držáku rohovek. Je to nutné k zajištění, že hodnoty propustnosti budou stanoveny správně pro výpočet IVIS za pomoci navrženého vzorce.

▼**M2**

OPACITOMETR

2. Opacitometr je přístroj pro měření světelné propustnosti. Světlo z halogenové lampy se posílá přes kontrolní část (prázdná komora bez okének nebo tekutiny) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které se nachází komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuněk se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce. Tím se určí zákalové jednotky.

3. Opacitometr by měl poskytnout lineární odezvu za pomoci řady údajů o zákalu, které zahrnují mezní hodnoty používané pro různé klasifikace popsané v modelu předpovědí (tj. až do mezní hodnoty, která určuje leptavost/silnou dráždivost). Aby se zajistily lineární a přesné údaje až do 75 – 80 zákalových jednotek, je nutné opacitometr kalibrovat s použitím řady kalibračních přístrojů. Kalibrátory (neprůhledné fólie z polyesteru) se umístí do kalibrační komory (komora rohovky určena k držení kalibrátorů) a čtou se na opacitometru. Kalibrační komora je určena k držení kalibrátorů přibližně ve stejné vzdálenosti mezi světlem a fotobuňkou, v jaké se umístí rohovky během měření zákalu. Opacitometr se nejdříve kalibruje na 0 zákalových jednotek s použitím kalibrační komory bez kalibrátoru. Potom se tři různé kalibrátory umístí jeden po druhém do kalibrační komory a měří se zákaly. Výsledkem kalibrátorů 1, 2 a 3 by měly být údaje o zákalu rovnající se příslušně nastaveným hodnotám 75, 150, a 225 zákalových jednotek, ± 5 %.

▼M2

B. 48 ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI

ÚVOD

1. Zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE – Isolated Chicken Eye) je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními použít pro klasifikaci látek a směsí jako látky s leptavými a silně dráždivými účinky na oči (1) (2) (3). Pro účely této zkušební metody jsou silně dráždivé látky definovány jako látky způsobující oční léze, které přetrvávají u králíků po dobu nejméně 21 dní po jejich podání. I když se metoda ICE nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se použít ji jako součást strategie stupňovitých zkoušek pro regulační klasifikaci a označování v rámci specifické oblasti použitelnosti (4) (5). Zkoušené látky a směsi (6), které jsou v této analýze pozitivní, lze klasifikovat jako látky s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči bez dalšího zkoušení na králících. Látka s negativním výsledkem zkoušky by si vyžádala zkoušení na králících s použitím strategie stupňovitého zkoušení, jak je uvedeno v metodice OECD 405 (7) (kapitola B. 5 této přílohy).

2. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních testovacích látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči měřené její schopností způsobit toxicitu v odstraněném kuřecím oku. Toxické účinky na rohovku se měří i) kvalitativním hodnocením zákalu, ii) kvalitativním hodnocením poškození epitelu na základě aplikace fluoresceinu do oka (zadržování fluoresceinu), iii) kvantitativním měřením zvýšené tloušťky (otok) a iv) kvalitativním hodnocením makroskopického morfologického poškození povrchu. Hodnocení zákalu a otoku rohovky a poškození po expozici zkoušené látce se posuzuje samostatně a potom se spojí za účelem odvození klasifikace dráždivých účinků na oči.

3. Látky s dráždivými účinky na oči způsobující léze, které odezní nejpozději do 21 dní a nedráždivé látky byly rovněž zkoušeny s použitím zkušební metody ICE. Přesnost a spolehlivost zkušební metody ICE u látek těchto kategorií však nebyla oficiálně hodnocena.

4. Definice jsou uvedeny v dodatku l.

POČÁTEČNÍ POSOUZENÍ A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu zkušební metody ICE Koordinačního výboru mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) (8) zpracovanému v návaznosti na mezinárodní studii o ověřování platnosti (4) (5) (9) s přispěním Evropského střediska pro ověřování platnosti alternativních metod, Japonského střediska pro validaci alternativních metod a oddělení toxikologie a aplikované farmakologie TNO Quality of Life (Nizozemsko). Protokol vychází z informací získaných z uveřejněných protokolů a také z aktuálního protokolu, který používá TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Omezení stanovená pro tuto metodu jsou založena na míře falešné pozitivity pro alkoholy a na mírách falešné negativity pro pevné látky a smáčedla (viz bod 47) (4). Jsou-li látky v rámci těchto chemických a fyzikálních tříd vyřazeny z databáze, přesnost ICE v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS je podstatně vyšší (4). Vycházeje z účelu této analýzy (tj. zjišťovat pouze látky s leptavými/silně dráždivými účinky na oči), míry falešné negativity nejsou kritické, protože tyto látky by se následně zkoušely na králících nebo jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* v závislosti na požadavcích právních předpisů s využitím strategie stupňovitého zkoušení v přístupu založeném na vážení důkazů. Kromě toho současná databáze ověřování platnosti neumožňuje odpovídající hodnocení některých chemických tříd nebo tříd produktů (např. směsí). Výzkumníci by však mohli zvážit použití této zkušební metody pro zkoušení všech druhů látek (včetně směsí), přičemž kladný výsledek by mohl být přijat jako příznak reakce očí na leptavé nebo silně dráždivé látky. Kladné výsledky získané u alkoholů by se však měly interpretovat opatrně z důvodu rizika nepřiměřené předpovědi.

7. Veškeré postupy u kuřecích očí by měly dodržovat nařízení a postupy použitelné na zkušebny pro zacházení s lidskými materiály nebo materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáně a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (15).

8. Omezení zkušební metody spočívá v tom, že i když přihlíží k některým účinkům na oči vyhodnoceným metodou zkoušení podráždění očí na králících a do určité míry i k jejich síle, nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky. Ačkoli reverzibilitu lézí rohovky nelze ve zkušební metodě ICE hodnotit samu o sobě, na základě studií o očích králíků bylo přesto navrženo, že by se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky mohlo použít k rozlišení mezi nevratnými a vratnými účinky (16). A konečně je třeba uvést, že zkušební metoda ICE neumožňuje posouzení potenciálu soustavné toxicity spojené s expozicí očí.

9. Vyvíjí se úsilí, aby se dále popsala účelnost a omezení zkušební metody ICE pro zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek (viz také bod 48). Uživatelům se rovněž doporučuje, aby organizacím pro ověřování platnosti poskytli vzorky a/nebo údaje pro oficiální hodnocení případného budoucího použití zkušební metody ICE, včetně zjišťování látek se slabými dráždivými a nedráždivými účinky na oči.

10. Každá laboratoř, která poprvé provádí tuto analýzu, by měla použít osvědčené chemické látky uvedené v dodatku 2. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti v používání zkušební metody ICE před předložením údajů ICE pro regulační účely klasifikace nebezpečí.

ZÁSADA ZKOUŠKY

11. Zkušební metoda ICE je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé uchování kuřecího oka *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou látkou posuzuje určením otoku a zákalu rohovky a zadržování fluoresceinu. Zatímco dva poslední parametry se týkají kvalitativního hodnocení, analýza otoku rohovky zajišťuje kvantitativní hodnocení. Každé měření se buď převádí na kvantitativní hodnotu používanou k výpočtu celkového ukazatele podráždění, nebo je přiřazeno kvalitativní kategorizaci, která se používá ke stanovení klasifikace leptavých a silně dráždivých účinků na oči *in vitro*. Každý z těchto výsledků potom může být použit k předvídání potenciálu zkoušené látky působit jako látka s leptavými a silně dráždivými účinky na oči *in vivo* (viz kritéria rozhodování).

▼M2

Zdroj a věk kuřecích očí

12. Tradičně se pro tuto analýzu používají kuřecí oči získané z jatek, kde se kuřata zabíjejí pro lidskou spotřebu, čímž se eliminuje potřeba laboratorních zvířat. Používají se pouze oči zdravých zvířat, které se považují za vhodné pro vstup do lidského potravinového řetězce.

13. Ačkoli nebyla zpracována kontrolní studie pro hodnocení optimálního věku kuřat, věk a hmotnost kuřat tradičně používaných v této zkušební metodě odpovídá mladým kuřatům tradičně zpracovávaným na jatkách pro drůbež (tj. přibližně 7 týdnů staré, o váze 1,5 – 2,5 kg).

Shromažďování a doprava očí do laboratoře

14. Hlavy by se měly odstranit ihned po usmrcení kuřat obvykle elektrickým šokem a naříznutím krku za účelem zbavení krve. Místní zdroj kuřat blízko laboratoře by měl být umístěn tak, aby hlavy kuřat mohly být dopraveny z jatek do laboratoře dostatečně rychle s cílem minimalizovat zkažení a/nebo bakteriální znečištění. Časový interval mezi shromážděním kuřecích hlav a použitím očí ve zkušební metodě ICE by měl být co nejkratší (zpravidla do dvou hodin) a měl by být prokázán, aby se nenarušily výsledky analýzy. Tyto výsledky vycházejí z kritérií výběru očí a také z reakcí na pozitivní a negativní kontroly. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí shromážděných v určitý den.

15. Protože oči se oddělují v laboratoři, neporušené hlavy se dopravují z jatek za okolní teploty v umělohmotných krabicích, které jsou navlhčeny ručníky namočenými v izotonickém fyziologickém roztoku.

Kritéria výběru očí používaných v ICE

16. Oči, které mají vysoké základní zbarvení fluoresceinem (tj. > 0,5) nebo vysokou hodnotu zákalu rohovky (tj. > 0,5) se po jejich odstranění vyřadí.

17. Každá zkušební skupina a souběžná pozitivní kontrola pozůstává nejméně ze třech očí. Skupina pro negativní kontrolu nebo pro kontrolu s rozpouštědlem (používá-li se jiné rozpouštědlo než fyziologický roztok) pozůstává nejméně z jednoho oka.

POSTUP

Příprava očí

18. Oční víčka se opatrně vyříznou a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Neporušenost rohovky se rychle posoudí kápnutím 2 % (objemové hmotnosti) fluoresceinu sodného aplikovaného na povrch rohovky po dobu několika vteřin, který se potom opláchne izotonickým fyziologickým roztokem. Oči ošetřené fluoresceinem se pak zkoumají pod mikroskopem se štěrbinovou lampou, aby se zajistilo, že se rohovka nepoškodí (tj. hodnoty zadržení fluoresceinu a zákalu rohovky $\leq$ 0,5).

19. Není-li oko poškozeno, vyřízne se z lebky a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Oční bulbus se vyjme z očnice tak, že se chirurgickou pinzetou pevně uchopí mžurka a oční sval se ustřihne zahnutými tupými nůžkami zakončenými hrotem. Je důležité zamezit poškození rohovky nadměrným tlakem (tj. kompresní artefakty).

20. Když je oko vyjmuto z očnice, viditelná část očního nervu by se měla nechat spojena. Jakmile se oko vyjme z očnice, položí se na absorpční podložku a mžurka a jiné pojivové tkáně se ustřihnou.

▼M2

21. Odstraněné oko se nasadí na nerezavý ocelový držák s rohovkou ve svislé poloze. Držák se potom přenese do komory chladícího přístroje (16). Držáky by se měly v chladícím přístroji postavit tak, aby kapky izotonického fyziologického roztoku dostávala celá rohovka. Teplota komor chladicího přístroje by měla být řízena na 32 ± 1,5 °C. V dodatku 3 je schématický nákres typického chladícího přístroje a očních držáků, které je možné obchodně získat nebo zkonstruovat. Přístroje mohou být upraveny, aby splňovaly potřeby jednotlivé laboratoře (např. umístění různého počtu očí).

22. Když se oči vloží do chladícího přístroje, znovu se prozkoumají pod mikroskopem se štěrbinovou lampou, aby se zjistilo, zda nebyly poškozeny během vyřezávání. Tloušťka rohovky by se v této době měla také měřit na vrcholu rohovky s použitím zařízení pro měření hlouby na mikroskopu se štěrbinovou lampou. Oči s: i) hodnotou zadržení fluoresceinu > 0,5; ii) zákalem rohovky > 0,5; nebo iii) jakýmikoli dalšími znaky poškození by se měly vyměnit. V případě očí nevyřazených na základě jakéhokoli z těchto kritérií se musí vyřadit jednotlivé oči s tloušťkou rohovky, která se o víc než 10 % odchyluje od střední hodnoty pro všechny oči. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že mikroskopy se štěrbinovou lampou by mohly ukazovat měření různé tloušťky rohovky, je-li rozdílné nastavení šířky štěrbiny. Šířka štěrbiny by se měla nastavit na 0,095 mm.

23. Poté, co byly oči prozkoumány a schváleny, inkubují se po dobu přibližně 45 až 60 minut, aby se uvedly do rovnováhy se zkušebním systémem před dávkováním. Po době vyrovnání se pro tloušťku rohovky a zákal zaznamená nulové referenční měření, které slouží jako základ (tj. čas = 0). Hodnota fluoresceinu stanovená při oddělování se pro tento koncový bod používá jako základní měření.

Aplikace zkoušené látky

24. Oči se (v držáku) ihned po nulovém referenčním měření vyberou z chladícího přístroje, postaví se do vodorovné polohy a na rohovku se aplikuje zkoušená látka.

25. Tekuté zkoušené látky se zpravidla zkoušejí neředěné, mohou se však ředit, pokud se to považuje za nutné (např. jako součást návrhu studie). Preferovaným ředidlem pro ředěné látky je fyziologický roztok. Za řízených podmínek lze však také použít alternativní ředidla, ale vhodnost jiných ředidel než fyziologického roztoku by se měla prokázat.

26. Tekuté zkoušené látky se aplikují na rohovku tak, že celý povrch rohovky se rovnoměrně pokryje zkoušenou látkou; obvyklý objem je 0,03 ml.

27. Podle možnosti by se pevné látky měly co nejjemněji položit do třecí misky a těrky nebo do srovnatelného drtícího prostředku. Prášek se aplikuje na rohovku tak, že se povrch stejnoměrně pokryje zkoušenou látkou; obvyklé množství je 0,03 g.

28. Zkoušená látka (tekutá nebo pevná) se aplikuje po dobu 10 vteřin a pak se z oka opláchne izotonickým fyziologickým roztokem (přibližně 20 ml) při okolní teplotě. Oko (v držáku) se potom v původní svislé poloze vrátí do chladícího přístroje.

Látky pro kontrolu

29. Do každého pokusu by měly být zařazeny souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.

▼M2

30. Když se zkoušejí 100 % tekuté látky nebo pevné látky, fyziologický roztok se ve zkušební metodě ICE používá pro souběžnou negativní kontrolu, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.

31. Když se zkoušejí zředěné tekuté látky, do zkušební metody se zařadí skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci. Jak je uvedeno v bodě 25, lze použít pouze rozpouštědlo/vehikul, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.

32. Do každého pokusu se zařadí známá látka s dráždivými účinky na oči jako souběžná pozitivní kontrola, aby se ověřilo, že je vyvolána odpovídající reakce. Protože analýza ICE se v této zkušební metodě používá ke zjišťování leptavých nebo silných dráždivých látek, pozitivní kontrola by měla být referenční látkou, která v této zkušební metodě vyvolá silnou reakci. Aby se však zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný. Měl by se vytvořit dostatek údajů *in vitro* pro pozitivní kontrolu, aby bylo možné vypočítat statisticky stanovený, přijatelný rozsah pozitivní kontroly. Nejsou-li údaje o zkušební metodě ICE z minulosti pro určitou pozitivní kontrolu k dispozici, bude nutné uskutečnit studie za účelem získání těchto informací.

33. Příklady tekutých zkoušených látek pro pozitivní kontroly jsou 10 % kyselina octová nebo 5 % benzalkonium chlorid, zatímco příklady pevných zkoušených látek pro pozitivní kontroly jsou hydroxid sodný nebo imidazol.

34. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek nebo produktů nebo pro hodnocení relativního potenciálu podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové body

35. Zkoušené rohovky se hodnotí předběžně ošetřené a hodnocení začíná ve 30, 75, 120, 180 a 240 minutách (± 5 minut) po oplachu po ošetření. Tyto časové body zajišťují odpovídající počet měření během čtyřhodinové doby zkoušení a přitom ponechávají dostatek času mezi měřeními, aby potřebná pozorování byla uskutečněna pro všechny oči.

36. Hodnocené koncové body jsou zákal a otok rohovky, zadržování fluoresceinu a morfologické účinky (např. tvoření jizev nebo uvolňování epitelu). Všechny koncové body kromě zadržování fluoresceinu (který je stanoven pouze v předběžné úpravě a 30 minut po expozici zkoušené látce) se určují v každém výše uvedeném časovém bodu.

37. Doporučují se fotografické snímky, aby se zdokumentoval zákal rohovky, zadržování fluoresceinu, morfologické účinky a histopatologie, pokud se provádí.

38. Uživatelům se po konečné zkoušce doporučuje, aby po uplynutí doby čtyř hodin uložili oči do vhodného fixačního prostředku (např. neutrální pufrovaný formalín) pro případné histopatologické vyšetření.

▼M2

39. Otok rohovky se určuje měřením tloušťky rohovky, které se provádí optickým pachymetrem pod mikroskopem se štěrbinovou lampou. Vyjadřuje se jako procento a vypočítává se z měření tloušťky rohovky podle následujícího vzorce:

$$\left[\frac{corneal\ thickness\ at\ time\ t - corneal\ thickness\ at\ time\ =\ 0}{corneal\ thickness\ at\ time\ =\ 0}\right] \times 100$$

40. Střední procento otoku rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty otoku rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodu se potom každé zkoušené látce přidělí celková hodnota kategorie.

41. Zákal rohovky se vypočítává s použitím plochy rohovky pro hodnocení, která je nejvíce zakalena. Střední hodnota zákalu rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty zákalu rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodě se potom každé zkoušené látce přidělí celková hodnota kategorie (tabulka 1).

Tabulka 1

Hodnoty zákalu rohovky

Hodnota	Pozorování
0	Žádný zákal.
0,5	Velmi slabý zákal.
1	Rozptýlené nebo roztroušené plochy; detaily duhovky jsou jasně viditelné.
2	Snadno rozeznatelná průhledná plocha; detaily duhovky jsou poněkud nejasné.
3	Silný zákal rohovky; nejsou viditelné žádné konkrétní detaily duhovky; velikost pupily je stěží rozeznatelná.
4	Úplný zákal rohovky; duhovka není viditelná.

42. Střední hodnota zadržování fluoresceinu se u všech zkoušených očí vypočítává pouze pro časový bod 30minutového pozorování, který se používá pro celkovou hodnotu kategorie přidělenou každé zkoušené látce (tabulka 2).

Tabulka 2

Hodnoty zadržování fluoresceinu

Hodnota	Pozorování
0	Žádné zadržování fluoresceinu.
0,5	Velmi slabé zbarvení jednotlivých buněk.
1	Zbarvení jednotlivých buněk se rozšířilo po zkoušené ploše rohovky.
2	Fokální nebo splývající úplné zbarvení jednotlivých buněk.
3	Splývající velké plochy zadržování fluoresceinu rohovky.

▼M2

43. Morfologické účinky zahrnují „jizvy“ na epiteliálních buňkách rohovky, „uvolňování“ epitelu, „zdrsnění“ povrchu rohovky a „nalepení“ zkoušené látky na rohovku. Tato zjištění se mohou ve své závažnosti měnit a mohou se vyskytovat souběžně. Klasifikace těchto zjištění je subjektivní podle interpretace výzkumníka.

ÚDAJE A PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení údajů

44. Výsledky ze zákalu a otoku rohovky a zadržování fluoresceinu by se měly hodnotit zvlášť, aby se pro každý koncový bod vytvořila třída ICE. Třídy ICE pro každý koncový bod se pak spojí za účelem vytvoření klasifikace dráždivých účinků pro každou zkoušenou látku.

Kritéria rozhodování

45. Poté, co byl každý koncový bod vyhodnocen, lze na základě předem určeného rozmezí přiřadit třídy ICE. Interpretace tloušťky (tabulka 3) a zákalu rohovky (tabulka 4) a zadržování fluoresceinu (tabulka 5) s použitím čtyř tříd ICE se uskutečňuje podle těchto měřítek:

Tabulka 3

Klasifikační kritéria ICE pro tloušťku rohovky

Střední otok rohovky (%) (*)	Třída ICE
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 min. po zkoušení)	II
> 12 až 18 (≤ 75 min. po zkoušení)	III
> 18 až 26	III
> 26 až 32 (> 75 min. po zkoušení)	III
> 26 až 32 (≤ 75 min. po zkoušení)	IV
> 32	IV

(*) Hodnoty otoku rohovky jsou použitelné pouze, měří-li se tloušťka pod mikroskopem se štěrbinovou lampou Haag-Streit BP900 s měřícím přístrojem na měření hloubky č. I a nastavením šířky štěrbiny na 9½, což se rovná 0,095 mm. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že mikroskopy se štěrbinovou lampou by mohly ukazovat měření různé tloušťky rohovky, je-li rozdílné nastavení šířky štěrbiny.

Tabulka 4

Klasifikační kritéria ICE pro zákal

Střední maximální hodnota zákalu (*)	Třída ICE
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 4,0	IV

(*) Viz tabulka 1.

▼M2

Tabulka 5

Klasifikační kritéria ICE pro střední zadržování fluoresceinu

Střední hodnota zadržování fluoresceinu 30 minut po zkoušení (*)	Třída ICE
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 3,0	IV

(*) Viz tabulka 2.

46. Klasifikace celkových dráždivých účinků *in vitro* pro zkoušenou látku se posuzuje z údajů klasifikace dráždivých účinků, která odpovídá kombinaci kategorií získaných pro otok rohovky, zákal rohovky a zadržování fluoresceinu a s použitím schématu uvedeného v tabulce 6.

Tabulka 6

Klasifikace celkových dráždivých účinků *in vitro*

Klasifikace	Kombinace 3 koncových bodů
Leptavá/silně dráždivá látka	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zákal rohovky ≥ 3 ve 30 min. (nejméně ve 2 očích) Zákal rohovky = 4 v každém časovém bodě (nejméně ve 2 očích) Silné uvolňování epitelu (nejméně v 1 oku)

(*) Výskyt těchto kombinací je méně pravděpodobný.

47. Jak je uvedeno v bodě 1, pokud zkoušená látka není zjištěna jako látka s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči, mělo by se uskutečnit další zkoušení pro účely klasifikace a označování. Zkušební metoda ICE má celkovou přesnost 83 % (120/144) až 87 % (134/154), míru falešné pozitivity 6 % (7/122) až 8 % (9/116) a míru falešné negativity 41 % (13/32) až 50 % (15/30) pro identifikaci látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči, ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků, klasifikovanými podle klasifikačních systémů EPA (1), EU (2) nebo GHS (3). V případě, že látky v určitých chemických (tj. alkoholy a smáčedla) a fyzikálních (tj. pevné látky) třídách jsou vyloučeny z databáze, přesnost ICE se v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS pohybuje v rozmezí od 91 % (75/82) do 92 % (69/75), míra falešné pozitivity od 5 % (4/73) do 6 % (4/70) a míra falešné negativity od 29 % (2/7) do 33 % (3/9) (4).

48. I když se klasifikace látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči pro zkoušenou látku nezíská, údaje ICE mohou být užitečné ve spojení s testovacími údaji z oční zkoušky *in vivo* na králících nebo z náležitě validované zkoušky *in vitro*, aby se dále vyhodnotila účelnost a omezení zkušební metody ICE pro zjištění slabých dráždivých a nedráždivých látek (dokument s pokyny o používání zkušebních metod oční toxicity *in vitro* se zpracovává).

▼M2

Kritéria přijetí studie

49. Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud souběžné negativní kontroly s vehikulem/ rozpouštědlem a souběžné pozitivní kontroly poskytnou klasifikaci dráždivých účinků, které spadají příslušně do tříd nedráždivých a silně dráždivých/leptavých látek.

Zpráva o zkoušce

50. Zpráva o zkoušce by měla zahrnovat tyto informace, pokud se týkají uskutečňování studie:

Zkoušené látky a látky pro kontrolu

Chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný službou chemických abstrakt (CAS), s dalšími názvy, jsou-li známy;

registrační číslo (RN) CAS, je-li známo;

čistota a složení látky nebo směsi (v procentu (procentech) podle váhy), jsou-li tyto informace dostupné;

fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stálost, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie;

případně ošetření zkoušených látek/látek pro kontrolu před zkoušením (např. zahřátí, mletí);

stálost, je-li známa.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie;

určení zdroje očí (např. zařízení, z něhož byly získány);

podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas shromáždění očí, časový interval před zahájením zkoušení);

specifické vlastnosti zvířat, z nichž byly získány oči, jsou-li tyto vlastnosti k dispozici (např. věk, pohlaví, hmotnost dárce).

Zdůvodnění použité zkušební metody a protokolu

Úplnost zkušební metody

Postup používaný k zajištění úplnosti (tj. přesnost a spolehlivost) zkušební metody v průběhu času (např. pravidelné zkoušení vhodných látek, využívání dosavadních údajů negativních a pozitivních kontrol).

Kritéria pro přijatelnou zkoušku

případně přijatelné rozsahy souběžných srovnávacích kontrol na základě dosavadních údajů.

Zkušební podmínky

Popis použitého zkušebního systému;

použitý mikroskop se štěrbinovou lampou (např. model);

nastavení přístroje pro používaný mikroskop se štěrbinovou lampou;

▼M2

informace o použitých kuřecích očích, včetně prohlášení o jejich kvalitě;

podrobnosti o použitém zkušebním postupu;

koncentrace použité zkoušené látky;

popis všech změn zkušebního postupu;

odkaz na dosavadní údaje modelu (např. negativní a pozitivní kontroly, vhodné látky, srovnávací látky);

popis použitých hodnotících kritérií.

Výsledky

popis jiných pozorovaných účinků;

případně fotografické snímky očí.

Posouzení výsledků

Závěr

LITERATURA

1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

2) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

3) Organizace spojených národů (OSN) (2007). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC), druhé revidované vydání, OSN New York a Ženeva, 2007. Dostupné na:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

4) ICCVAM (2007). Zpráva o hodnocení zkušební metody – zkušební metody *oční toxicity in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

5) ESAC (2007). Prohlášení o uzavření retrospektivní studie ICCVAM o orgánových analýzách *in vitro* jako screeningové testy pro zjišťování potenciálních látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči. Dostupné na:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

6) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

7) OECD (2002). Metodika 405. Pokyn OECD pro zkoušení chemických látek. Akutní podráždění/poleptání očí. Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

▼**M2**

8) ICCVAM (2007). Doporučený protokol zkušební metody ICE ICCVAM. Ve: Zprávě o hodnocení zkušební metody ICCVAM – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

9) ICCVAM. (2006). Současný stav zkušebních metod *In Vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Publikace NIH č.: 06-4513. Research Triangle Park: národní toxikologický program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].

10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

11) INVITTOX (1994). Protokol 80: Zkouška odstraněného kuřecího oka (CEET). Dostupné na: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupné na:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

18) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

19) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼M2

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a očnici a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené látce. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Otok rohovky: Objektivní měření rozsahu zduření rohovky ve zkoušce ICE po expozici zkoušené látce. Vyjadřuje se procentuálně a vypočítává se z měření základní tloušťky rohovky (před dávkováním) a tloušťky zaznamenávané v pravidelných intervalech po vystavení zkoušené látce ve zkoušce ICE. Stupeň otoku rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Kategorie 1 EPA: Zasažení poleptáním (nevratné poškození oční tkáně) nebo zasažení rohovky či dráždění přetrvávající déle než 21 dní (1).

Kategorie R41 EU: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (2).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Zadržování fluoresceinu: Subjektivní měření rozsahu fluoresceinu sodného ve zkoušce ICE, který je zadržován buňkami epitelu v rohovce po expozici zkoušené látce. Stupeň zadržování fluoresceinu je příznačný pro poškození epitelu rohovky.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): Systém klasifikace chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních rizik a odpovídajícího označpvání pomocí prvků informací o nebezpečnosti, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, aby byly poskytnuty informace o jejich nepříznivých účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, dopravců, spotřebitelů a respondérů nebezpečí) a životního prostředí (3).

▼M2

Kategorie 1 GHS: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (3).

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Negativní kontrola: Nezkoušená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené látky a jinými kontrolními vzorky, aby se určilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Nedráždivá látka: Látky, které nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie I, II, nebo III EPA; kategorie R41 nebo R36 EU; nebo kategorie 1, 2A, nebo 2B GHS (1)(2)(3).

Látka s leptavými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratné poškození tkání očí. b) Látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1)(2)(3).

Látka s dráždivými účinky na oči: a) látka, která způsobuje nevratnou změnu v oku po aplikaci na přední plochu oka; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie II nebo III EPA, kategorie R36 EU nebo kategorie 2A nebo 2B GHS (1) (2) (3).

Silně dráždivá látka: a) Látka, která způsobuje poškození tkání v oku po aplikaci na přední plochu oka, které není vratné do 21 dní od aplikace, nebo způsobuje vážné fyzické snížení vidění. b) Látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1)(2)(3).

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný.

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém se zkušební metoda může časem použít opakovaně v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Mikroskop se štěrbinovou lampou: Přístroj používaný k přímému vyšetření oka se zvětšením pod binokulárním mikroskopem a vytvořením stereoskopického, přímého obrazu. Ve zkušební metodě ICE se tento přístroj používá k prohlížení předních struktur kuřecího oka a také k objektivnímu měření tloušťky rohovky s přídavným zařízením na měření hloubky.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikulu, který se zpracovává s ošetřenou zkoušenou látkou a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší se souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

▼M2

Stupňovité zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže na základě existujících informací nelze určit potenciál dráždivých účinků zkoušené látky, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech, dokud se neurčí jednoznačná klasifikace.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, pro kterou byly zpracovány validační studie s cílem určit důležitost (včetně přesnosti) a spolehlivost pro specifický účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼M2

Dodatek 2

VHODNÉ CHEMICKÉ LÁTKY PRO ZKUŠEBNÍ METODU ICE

Než laboratoře rutinně použijí zkušební metodu, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace 10 látek s dráždivými účinky na oči doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí pro místní podráždění/-poleptání očí, který vychází z výsledků očních zkoušek *in vivo* na králících (TG 405) (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo neklasifikované či označené podle GHS OSN (3)(7). S přihlédnutím k validované účelnosti těchto analýz (tj. zjišťování pouze látek s leptavými/silně dráždivými účinky na oči) však existují pouze dva výsledky zkoušky pro klasifikační účely (leptavá/silně dráždivá látka nebo neleptavá/slabá dráždivá látka), aby byla prokázána odborná způsobilost. Dalším kritériem výběru bylo to, zda látka je komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou k dispozici kvalitní údaje ze dvou metod *in vitro*, pro které byly zpracovány metodiky. Z tohoto důvodu byly dráždivé látky vybrány z doporučeného seznamu 122 referenčních látek ICCVAM pro ověření platnosti zkušebních metod oční toxicity *in vitro* (viz dodatek H: Seznam doporučených referenčních látek ICCVAM) (4). Referenční údaje jsou dostupné v základním dokumentu o přezkumu ICCVAM pro zkušební metodu pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP) a zkušební metodu odděleného kuřecího oka (ICE) (18) (19).

Tabulka 1

Doporučené látky k prokázání odborné způsobilosti pro ICE

Chemická látka	CASRN	Třída chemických látek (*)	Fyzikální forma	Klasifikace (*)*in vivo*	Klasifikace (*)*in vitro*
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dibenzoyl-L–tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Kyselina trichloroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dichlorobenzoylchlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Tekutá	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Ethyl-2-metylaceto–acetát	609-14-3	Keton, ester	Tekutá	Kategorie 2B	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka

▼**M2**

Chemická látka	CASRN	Třída chemických látek (*)	Fyzikální forma	Klasifikace (*)*in vivo*	Klasifikace (*)*in vitro*
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka
n-hexan	110-54-3	Uhlovodík (acyklický)	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka

Zkratky: CASRN = registrační číslo podle služby chemických abstrakt

([1]) Chemické třídy byly přiděleny každé zkoušené látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupný na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

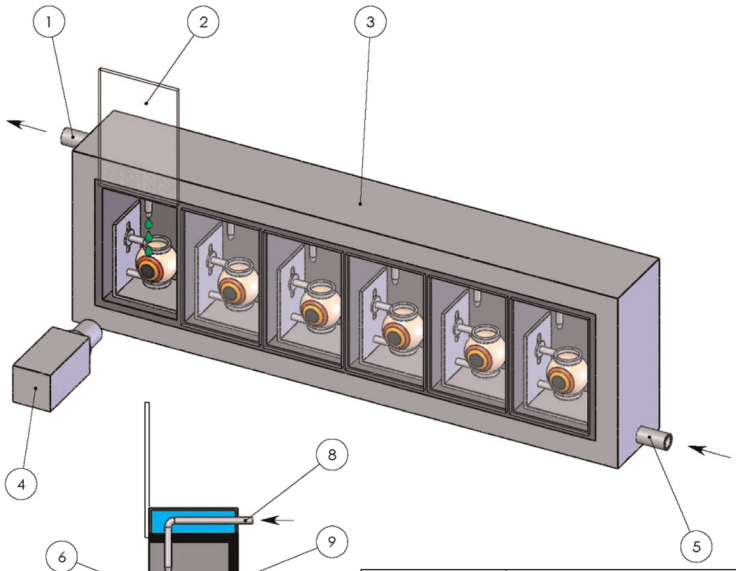
([3]) Založena na výsledcích v BCOP a ICE.

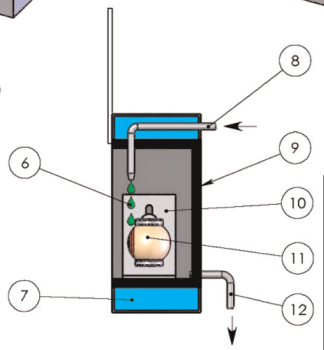
▼M2

Dodatek 3

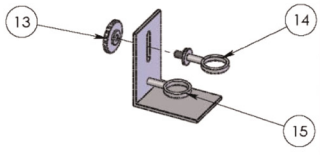
Schématický nákres chladícího přístroje a držáků očí ICE

Další obecně použitelné popisy chladícího přístroje a držáku očí viz Burton et al. (17)





PRŮŘEZ KOMOROU



DRŽÁK OČÍ

POLOŽKA Č.	POPIS
1	ODVOD TEPLÉ VODY
2	POSUVNÝ KRYT
3	SPECIÁLNÍ ZKUŠEBNÍ PŘÍSTROJ
4	OPTICKÝ MĚŘICÍ PŘÍSTROJ
5	PŘÍVOD TEPLÉ VODY
6	SOLNÝ ROZTOK
7	TEPLÁ VODA
8	PŘÍVOD SOLNÉHO ROZTOKU
9	KOMORA
10	DRŽÁK OČÍ
11	KUŘECÍ OKO
12	ODVOD SOLNÉHO ROZTOKU
13	ŠROUBOVÁ SVORKA
14	NASTAVITELNÉ HORNÍ RAMENO
15	PEVNÉ DOLNÍ RAMENO

▼M3

B.49 ZKOUŠKA *IN VITRO* NA PŘÍTOMNOST MIKROJADER V BUŇKÁCH SAVCŮ

ÚVOD

1. Zkouška *in vitro* na přítomnost mikrojader (MNvit) je zkouška genotoxicity pro zjišťování přítomnosti mikrojader v cytoplazmě interfázových buněk. Mikrojádra mohou pocházet z acentrických fragmentů chromozomů (tzn. fragmentů, jimž chybí centromera) nebo z celých chromozomů, které nejsou při buněčném dělení schopny se ve stádiu anafáze rozejít k pólům. Zkouška zjišťuje působení klastogenních a aneugenních chemikálií (látek a směsí) (1) (2) v buňkách, které prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po expozici zkoušené látce. Tato zkušební metoda (ZM) umožňuje používat protokoly s inhibitorem polymerace aktinu, cytochalasinem B (cytoB), i bez něho. 5. Přidání cytoB před cílovou mitózou umožňuje identifikaci a selektivní analýzu četnosti výskytu mikrojader v buňkách, které prodělaly jednu mitózu, protože tyto buňky jsou dvoujaderné (3) (4). Tato ZM rovněž umožňuje použití protokolů bez blokování cytokineze, pokud existují důkazy, že analyzovaná populace buněk prodělala mitózu.

2. Kromě použití zkoušky MNvit pro identifikaci chemikálií (látek a směsí), které vyvolávají vznik mikrojader, lze informace o mechanismech poškození chromozomů a tvorbě mikrojader získat rovněž použitím blokování cytokineze, imunochemického značení kinetochorů nebo hybridizace za použití centromerických/telomerických sond (fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Postupy značení a hybridizace lze použít, pokud dojde ke zvýšené tvorbě mikrojader a zkoušející chce zjistit, zda je toto zvýšení výsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení.

3. Mikrojádra představují poškození přenesené na dceřiné buňky, zatímco chromozomové aberace zjištěné v metafázových buňkách se přenášet nemusí. Jelikož mikrojádra v interfázových buňkách lze posuzovat poměrně objektivně, laboratorní personál potřebuje pouze zjistit, zda buňky prošly dělením, či nikoli, a kolik buněk obsahuje mikrojádra. Díky tomu lze preparáty vyhodnotit poměrně rychle a analýzu lze automatizovat. Proto je praktické hodnotit při každé zkoušce tisíce namísto stovek buněk, čímž se zvyšuje výkonnost této metody. A konečně, jelikož mikrojádra mohou vznikat z méně vyvinutých chromozomů, je možno zjišťovat látky, které vyvolávají aneuploidii, jež lze obtížně studovat za použití běžných zkoušek na chromozomové aberace, např. podle zkušební metodiky OECD č. 473 (kapitola B.10 této přílohy) (17). Zkouška MNvit však neumožňuje odlišit chemické látky vyvolávající polyploidii od látek vyvolávajících klastogenicitu bez speciálních postupů, jako je například metoda FISH popsaná v odstavci 2.

4. Zkouška MNvit je metoda *in vitro*, která obvykle využívá kultivované lidské buňky nebo buňky pocházející z hlodavců. Poskytuje komplexní základ pro vyšetřování potenciálu látek poškozovat chromozomy *in vitro*, protože jejím prostřednictvím lze detekovat aneugeny i klastogeny.

5. Zkouška MNvit je robustní a účinná u široké škály různých typů buněk, za přítomnosti nebo nepřítomnosti cytoB. Existuje množství údajů potvrzujících platnost zkoušky MNvit za použití různých buněčných linií pocházejících z hlodavců (CHO, V79, CHL/IU a L5178Y) a také za použití lidských lymfocytů (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Patří mezi ně zejména mezinárodní validační studie

▼M3

koordinované společností Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) a zprávy z Mezinárodního semináře o zkoušení genotoxicity (4) (16). Dostupné údaje byly rovněž přehodnoceny v retrospektivní validační studii v rámci přístupu založeného na vážení důkazů, provedené Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) Evropské komise, a zkušební metoda byla potvrzena jako vědecky platná vědeckým poradním výborem ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Bylo popsáno využití lidské linie lymfoblastoidních buněk TK6 (35), buněk HepG2 (36) (37) a primárních buněk z embryí syrského křečka (38), ačkoli nebyly použity ve validačních studiích.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití exogenního zdroje metabolické aktivace, pokud nejsou buňky metabolicky kompetentní s ohledem na zkoušené látky. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*. Je také nutno zabránit vzniku podmínek, které by vedly k uměle pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu zkoušené látky, a které mohou nastat působením takových faktorů, jako jsou výrazné změny pH nebo osmolality, nebo v důsledku vysokých úrovní cytotoxicity (39) (40) (41). Pokud zkoušená látka způsobí při přidání změnu pH kultivačního média, je nutno hodnotu pH upravit, nejlépe pufrováním zásobního roztoku tak, aby všechny objemy ve všech zkoušených koncentracích a pro všechny kontroly zůstaly stejné.

8. Pro analýzu indukce vzniku mikrojader je nezbytné, aby proběhla mitóza v exponovaných i neexponovaných kulturách. Nejinformativnější fází pro hodnocení výskytu mikrojader jsou buňky, které prodělaly jednu mitózu během expozice nebo po expozici zkoušené látce.

PODSTATA ZKOUŠKY

9. Buněčné kultury lidského a savčího původu jsou vystaveny zkoušené látce za přítomnosti exogenního zdroje metabolické aktivace i bez něho, pokud ovšem nejsou použity buňky s dostatečnou schopností metabolismu. Do všech zkoušek se zařadí souběžné kontroly s rozpouštědlem nebo vehikulem a pozitivní kontrolní látky.

10. Během nebo po expozici zkoušené látce se buňky kultivují dostatečně dlouho, aby poškození chromozomů nebo dělicího vřeténka vedlo v interfázových buňkách ke vzniku mikrojader. Pro vyvolání aneuploidie by měla být zkoušená látka obvykle přítomna při mitóze. Získané a obarvené interfázové buňky se analyzují na přítomnost mikrojader. V ideálním případě by měla být přítomnost mikrojader zjištěna pouze v těch buňkách, které prodělaly mitózu během expozice zkoušené látce nebo během postexpoziční doby, pokud se používá. V kulturách, které byly ošetřeny blokátorem cytokineze, se toho dosáhne tím, že se zaznamenají pouze dvoujaderné buňky. V případě nepřítomnosti blokátoru cytokineze je nutno prokázat, že analyzované buňky pravděpodobně prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po expozici zkoušené látce. U všech protokolů je důležité prokázat, že došlo k proliferaci buněk jak v kontrolních, tak v ošetřených kulturách, a také je třeba v kulturách (nebo v paralelních kulturách), u nichž se hodnotí výskyt mikrojader, posoudit míru cytotoxicity nebo cytostáze.

▼M3

POPIS ZKOUŠKY

Preparáty

11. Lze použít kultivované primární lidské lymfocyty z periferní krve (5) (19) (42) (43) a celou řadu buněčných linií pocházejících z hlodavců, například buňky CHO, V79, CHL/IU a L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Použití jiných buněčných linií a druhů by mělo být odůvodněno na základě jejich prokázané funkčnosti ve zkoušce, jak je popsáno v části „Kritéria přijatelnosti". Jelikož četnost mikrojader v rámci přirozeného pozadí ovlivní citlivost testu, doporučuje se používat druhy buněk s nízkou, stabilní četností tvorby mikrojader v rámci přirozeného pozadí.

12. Lidské lymfocyty z periferní krve by měly být získány od mladých (přibližně ve věku 18–35 let) zdravých nekuřáků bez jakékoli známé nedávné expozice genotoxickým látkám nebo radiaci. Pokud se společně používají buňky pocházející od více než jednoho dárce, měl by být počet dárců uveden. Četnost mikrojader se zvyšuje s věkem a tato tendence je výraznější u žen než u mužů (44), což je třeba vzít v úvahu při výběru dárcovských buněk pro společné použití.

Média a podmínky kultivace

13. Pro udržování kultur by se měla používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO_2, teplota a vlhkost). U stabilizovaných buněčných linií a kmenů by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty. Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Je třeba, aby bylo známo normální trvání buněčného cyklu při kultivačních podmínkách použitých ve zkušební laboratoři. V případě použití metody s blokováním cytokineze by se koncentrace inhibitoru cytokineze měla optimalizovat pro konkrétní typ buněk a mělo by se prokázat, že tato koncentrace poskytuje dostatečné množství dvoujaderných buněk pro vyhodnocení zkoušky.

Příprava kultur

14. Stabilizované buněčné linie a kmeny: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby před odebráním nedosáhly běžné kultury konfluence v monovrstvách a aby suspenzní kultury nedosáhly nadměrné hustoty, a inkubují se při teplotě 37 °C.

15. Lymfocyty: plná krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty se před expozicí zkoušené látce a cytoB kultivují za přítomnosti mitogenu, např. fytohemaglutininu (PHA).

Metabolická aktivace

16. Při použití buněk s nedostatečnou endogenní metabolickou schopností by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců ošetřených činidlem vyvolávajícím tvorbu enzymů, jako je například Aroclor 1254 (45) (46), nebo směsí fenobarbitonu a β-naftoflavonu (46) (47) (48) (49). Použití uvedené směsi není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (50) a s nařízením (ES) č. 850/2004 o perzistentních organických znečišťujících látkách (66), přičemž bylo prokázáno, že co se týče vyvolání tvorby oxidáz se smíšenou funkcí, je tato směs stejně účinná jako Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). V konečném zkušebním médiu se frakce S9 obvykle používá v koncentracích od 1 do 10 % (v objemovém vyjádření). Stav systému pro aktivaci metabolismu může záviset na chemické třídě zkoušené látky a v některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci S9.

▼M3

17. Geneticky modifikované buněčné linie vylučující aktivační enzymy specifické pro preparáty získané od lidí a hlodavců mohou eliminovat potřebu exogenního systému pro aktivaci metabolismu a lze je používat jako zkušební buňky. V takových případech je nutno volbu použitých buněčných linií vědecky zdůvodnit, např. důležitostí oxidáz se smíšenou funkcí pro metabolismus zkoušené látky (51) a jejich schopností reagovat na známé klastogeny a aneugeny (viz samostatná část „Kritéria přijatelnosti“). Je třeba počítat s tím, že zkoušené látky nemusí být vyloučenou oxidázou (vyloučenými oxidázami) se smíšenou funkcí metabolizovány; v tom případě by negativní výsledky neprokazovaly, že zkoušená látka nemůže vyvolávat tvorbu mikrojader.

Příprava zkoušené látky

18. Pevné chemické látky by se měly před použitím k ošetření buněk rozpustit ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření buněk zředit. Plyny a těkavé látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených nádobách (52) (53). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky:

Rozpouštědla nebo vehikula

19. Rozpouštědlo nebo vehikulum nesmí reagovat se zkoušenou látkou a při použité koncentraci nesmí být neslučitelné s přežitím buněk nebo s udržením aktivity S9. Pokud se používají jiná než zavedená rozpouštědla nebo vehikula (jako jsou například voda, médium pro kultivaci buněk, dimethylsulfoxid), je nutno jejich použití podpořit údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenou látkou a o tom, že nejsou genotoxické. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula.

Používání cytoB jako blokátoru cytokineze

20. Jedním z nejdůležitějších hledisek při provádění zkoušky MNvit je zajistit, aby hodnocené buňky prodělaly mitózu během expozice zkoušené látce nebo během postexpoziční doby, pokud se používá. CytoB je látka, která se nejčastěji používá k blokování cytokineze, protože inhibuje sestavení aktinu a tím zabraňuje oddělení dceřiných buněk po mitóze, což vede ke vzniku dvoujaderných buněk (5) (54) (55). Proto lze hodnocení výskytu mikrojader omezit pouze na buňky, které prodělaly mitózu během ošetření zkoušenou látkou nebo po něm. Současně lze měřit účinek zkoušené látky na kinetiku buněčné proliferace. CytoB by se měl používat jako blokátor cytokineze při použití lidských lymfocytů, protože délky trvání buněčného cyklu budou u různých kultur a dárců proměnlivé a protože ne všechny lymfocyty budou reagovat na PHA. Při zkoušení buněčných linií za účelem určení, zda se hodnocené buňky rozdělily, se používají i jiné metody, jež jsou uvedeny níže (viz odstavec 26).

21. V laboratoři by se měla stanovit vhodná koncentrace cytoB pro každý druh buněk, aby se dosáhlo optimální četnosti dvoujaderných buněk v kontrolních kulturách s rozpouštědlem/vehikulem. Vhodná koncentrace cytoB obvykle činí 3 až 6 mg/ml.

▼M3

Měření buněčné proliferace a cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

22. Při určování nejvyšší koncentrace zkušební látky je nutno se vyhnout koncentracím, které mají schopnost produkovat uměle pozitivní odezvy, například koncentracím, jež vyvolávají velmi vysokou cytotoxicitu, vysrážení v kultivačním médiu a výrazné změny pH nebo osmolality (39) (40) (41).

23. Měření buněčné proliferace se provádí proto, aby bylo zajištěno, že ošetřené buňky prodělaly během zkoušky mitózu a že se jednotlivá ošetření provádějí při vhodných úrovních cytotoxicity (viz odstavec 29). Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace u buněk, které vyžadují metabolickou aktivaci pomocí relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo relativního zdvojnásobení populace (RPD) (příslušné vzorce viz dodatek 2), pokud se ovšem nepoužívá cytoB. Při použití cytoB lze cytotoxicitu stanovit za použití replikačního indexu (RI) (příslušný vzorec viz dodatek 2).

24. Ošetření kultur cytoB a měření relativních četností jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk v kultuře představuje přesnou metodu kvantifikace účinku na buněčnou proliferaci a cytotoxického nebo cytostatického působení látky použité k ošetření kultury (5) a zajišťuje, že se hodnotí pouze buňky, které prodělaly buněčné dělení během ošetření nebo po něm.

25. Ve studiích s cytoB lze cytostázi nebo cytotoxicitu kvantifikovat podle proliferačního indexu při blokování cytokineze (CBPI) (5) (26) (56) nebo mohou být odvozeny z RI nejméně 500 buněk v každé kultuře (příslušné vzorce viz dodatek 2). Když se k posouzení buněčné proliferace používá cytoB, měl by se CBPI nebo RI určit nejméně u 500 buněk v každé kultuře. Tato měření lze mimo jiné použít k odhadu cytotoxicity porovnáním hodnot u exponované kultury s hodnotami u kontrolní kultury. Užitečné informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity (např. konfluence, počtu buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází).

26. Ve studiích bez použití cytoB je nutno prokázat, že hodnocené buňky v kultuře prodělaly buněčné dělení během ošetření zkoušenou látkou nebo po něm, jinak mohou vznikat falešně negativní odezvy. Mezi metody, které se doposud používaly k zajištění toho, aby se hodnotily pouze buňky, které prodělaly buněčné dělení, patří vpravení a následná detekce bromdeoxyuridinu (BrdU), který umožňuje identifikovat buňky, které se replikovaly (57), vytváření klonů, když se buňky z permanentních buněčných linií ošetřují a hodnotí *in situ* na mikroskopickém sklíčku (proliferační index (PI)) (25) (26) (27) (28), nebo měření relativního zdvojnásobení populace (RPD) či relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo jiné osvědčené metody (16) (56) (58) (59) (příslušné vzorce viz dodatek 2). Užitečné informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity nebo cytostáze (např. konfluence, počtu buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází).

27. Měly by se vyhodnotit nejméně tři analyzovatelné zkušební koncentrace. K tomu může být nezbytné provést experiment za použití většího množství podobných koncentrací a analyzovat tvorbu mikrojader v těch koncentracích, jež poskytují vhodný rozsah hodnot cytotoxicity. Alternativní strategie spočívá v provedení předběžné zkoušky cytotoxicity, aby se zúžil rozsah pro konečnou zkoušku.

28. Cílem je, aby nejvyšší koncentrace poskytla 55 ± 5 % cytotoxicitu. 32. Vyšší úrovně mohou jako sekundární efekt cytotoxicity vyvolat poškození chromozomů (60). Pokud dochází k výskytu cytotoxicity, měly by zvolené koncentrace pokrývat širokou škálu hodnot, které způsobují různé úrovně cytotoxicity od 55 ± 5 % cytotoxicity až po nízkou nebo žádnou cytotoxicitu.

▼M3

29. Pokud není zjištěna žádná cytotoxicita nebo je pozorován vznik sraženiny, měla by nejvyšší zkušební koncentrace odpovídat nejnižší z hodnot 0,01 M, 5 mg/ml nebo 5 μl/ml. Vzájemný rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi zvolenými pro analýzu by obecně neměly činit více než 10 %. U zkoušených látek, které vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, může být nezbytné, zvolit menší kroky mezi jednotlivými koncentracemi zkoušené látky, aby mohly být ohodnoceny i kultury se středními a nízkými rozsahy toxicity.

30. Když je limitujícím faktorem rozpustnost, měla by se maximální koncentrace, pokud není omezena cytotoxicitou, rovnat nejnižší koncentraci, při které je v kulturách viditelná minimální sraženina, pokud to ovšem neovlivní vyhodnocení. Hodnocení precipitace by se mělo provádět takovými metodami, jako je světelná mikroskopie, přičemž je nutno si všímat sraženiny, která přetrvává nebo se objeví během kultivace (před ukončením expozice).

Kontroly

31. Součástí každého experimentu by měly být souběžné pozitivní kontroly a kontroly s rozpouštědlem/vehikulem při současné metabolické aktivaci a bez ní.

32. Pozitivní kontroly jsou nezbytné k prokázání schopnosti použitých buněk a zkušebního protokolu identifikovat klastogeny a aneugeny a potvrdit metabolickou schopnost přípravku S9. Pozitivní kontrola by měla využívat známé látky podněcující tvorbu mikrojader v koncentracích, u nichž se předpokládá malé, avšak reprodukovatelné zvýšení nad hodnoty pozadí, a měla by prokázat citlivost zkušebního systému. Koncentrace pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo totožnost kódovaného preparátu.

33. Klastogenní látka, která vyžaduje metabolickou aktivaci (např. cyklofosfamid, benzo[a]pyren) by se měla použít k prokázání jak schopnosti metabolismu buněk, tak schopnosti zkušebního systému zjistit přítomnost klastogenů. V odůvodněných případech lze používat i další pozitivní kontroly. Jelikož některé pozitivní kontroly, které vyžadují metabolickou aktivaci, mohou za určitých podmínek ošetření nebo u určitých buněčných linií působit i bez exogenní metabolické aktivace, je nutno u zvolené buněčné linie při zvolených koncentracích otestovat potřebnost metabolické aktivace a rovněž účinnost přípravku S9.

34. V současné době nejsou známy žádné aneugenní látky, které by ke svému genotoxickému působení vyžadovaly metabolickou aktivaci (16). Mezi v současnosti uznávané pozitivní kontroly aneugenního působení patří například kolchicin a vinblastin. Jiné chemické látky lze použít v případě, že vyvolávají vznik mikrojader výhradně nebo převážně prostřednictvím aneugenního působení. Aby nebyly nutné dvě pozitivní kontroly (na klastogenicitu a aneugenicitu) bez metabolické aktivace, může kontrola aneugenicity sloužit jako pozitivní kontrola bez použití přípravku S9 a kontrolu klastogenicity lze využít k testování vhodnosti použitého systému metabolické aktivace. Pozitivní kontrola na klastogenicitu a aneugenicitu by se měly používat u buněk, které nevyžadují použití přípravku S9. Navrhované pozitivní kontroly jsou uvedeny v dodatku 3.

35. Lze zvážit použití pozitivní kontroly související s určitou chemickou třídou, pokud jsou k dispozici vhodné chemické látky. Všechny použité pozitivní kontroly by měly být vhodné pro daný druh buněk a podmínky aktivace.

▼M3

36. Studie by měla zahrnovat kontroly s rozpouštědlem/vehikulem při každém odběru buněk k vyhodnocení. Kromě toho by se měly používat rovněž neošetřené negativní kontroly (bez rozpouštědla/vehikula), pokud nejsou publikovány nebo pokud nemá laboratoř dřívější kontrolní údaje, jež prokazují, že zvolené rozpouštědlo při použitých koncentracích nevyvolává žádné genotoxické ani jiné škodlivé účinky.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Harmonogram aplikace

37. Aby se maximalizovala pravděpodobnost detekce aneugenní nebo klastogenní látky působící v určitém stadiu buněčného cyklu, je důležité, aby byl dostatečný počet buněk ošetřen zkoušenou látkou ve všech fázích jejich buněčných cyklů. Harmonogram aplikace pro buněčné linie a primární buněčné kultury se proto může poněkud lišit od harmonogramu aplikace u lymfocytů, které k zahájení svého buněčného cyklu potřebují mitogenní stimulaci, přičemž o jednotlivých harmonogramech pojednávají odstavce 41 až 43 (16).

38. Teoretické úvahy spolu s publikovanými údaji (18) ukazují, že většina aneugenních a klastogenních látek bude detekována za použití krátkodobé expozice v trvání 3 až 6 hodin za přítomnosti i nepřítomnosti přípravku S9, po níž následuje odstranění zkoušené látky a doba růstu v délce 1,5 až 2,0 buněčných cyklů (6). Vzorky buněk se odebírají v době odpovídající asi 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžného buněčného cyklu (tzn. bez aplikace zkoušené látky), buď po začátku nebo na konci aplikace (viz tabulka 1). Intervaly odběru vzorků nebo obnovy kultur lze prodloužit, pokud je známo nebo existuje podezření, že zkoušená látka ovlivňuje trvání buněčného cyklu (například při zkoušení analogů nukleosidů).

39. Vzhledem k možnému cytotoxickému působení přípravků S9 na kultivované savčí buňky se prodloužená expozice v trvání 1,5násobku až 2,0násobku běžných buněčných cyklů používá jen za nepřítomnosti S9. Při prodloužené expozici existují možnosti, které dovolují ošetřit buňky zkoušenou látkou za nepřítomnosti nebo za přítomnosti cytoB. Tyto možnosti jsou určeny pro situace, kdy mohou být obavy ohledně možných interakcí mezi zkoušenou látkou a cytoB.

40. Navrhované harmonogramy expozice buněk jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto obecné harmonogramy expozice lze upravit v závislosti na stabilitě a reaktivitě zkoušené látky nebo zvláštních růstových charakteristikách použitých buněk. Veškeré expozice by měly být zahájeny a ukončeny v okamžiku, kdy počet buněk exponenciálně narůstá. Tyto harmonogramy jsou podrobněji uvedeny v následujících odstavcích 41 až 47.

Tabulka 1

Doby expozic a odběru buněk k vyhodnocení v rámci zkoušky MNvit

Lymfocyty, primární buňky a buněčné linie ošetřené s cytoB	+ S9	Expozice po dobu 3–6 hod. za přítomnosti S9; odstranění S9 a expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
	– S9 Krátká expozice	Expozice po dobu 3–6 hod.; odstranění expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

▼M3

	– S9 Prodloužená expozice	*Možnost A:* Expozice po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů za přítomnosti cytoB; odběr k vyhodnocení na konci doby expozice. *Možnost B:* Expozice po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů; odstranění zkušební látky; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
Buněčné linie ošetřené bez cytoB (Harmonogramy jsou shodné s harmonogramy uvedenými výše s výjimkou toho, že se nepřidává žádný cytoB.)		

Lymfocyty, primární buňky a buněčné linie s cytoB

41. U lymfocytů je nejúčinnější zahájit expozici zkoušené látce za 44–48 hodin po stimulaci PHA, až zmizí synchronizace cyklů (5). Při úvodní zkoušce se nechá na buňky působit zkoušená látka po dobu 3 až 6 hodin za nepřítomnosti a za přítomnosti S9. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem obsahujícím cytoB a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

42. Pokud jsou obě úvodní zkoušky s krátkou expozicí (3–6 hod.) negativní nebo nejednoznačné, použije se následná prodloužená expozice bez přítomnosti S9. K dispozici jsou dvě možnosti provedení zkoušky, přičemž obě jsou stejně přijatelné. Může však být vhodnější postupovat podle možnosti A pro stimulované lymfocyty, kde může exponenciální nárůst počtu buněk začít 96 hodin po stimulaci klesat. Při použití možnosti B by také buněčné kultury neměly před konečným odběrem vzorku dosáhnout konfluence.

— Možnost A: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů a odeberou se k vyhodnocení na konci doby expozice.

— Možnost B: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

43. Primární buňky a buněčné linie je nutno ošetřit stejným způsobem jako lymfocyty kromě toho, že není nutno je stimulovat pomocí PHA po dobu 44–48 hodin. Jiné buňky než lymfocyty by měly být vystaveny působení zkoušené látky tak, aby v okamžiku ukončení studie byly buňky stále ve fázi růstu, při které se jejich počet exponenciálně zvyšuje.

Buněčné linie bez cytoB

44. Buňky je nutno vystavit působení zkoušené látky po dobu 3–6 hodin za přítomnosti a nepřítomnosti S9. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

▼M3

45. Pokud jsou obě úvodní zkoušky s krátkou expozicí (3–6 hod.) negativní nebo nejednoznačné, použije se následná prodloužená expozice (bez přítomnosti S9). K dispozici jsou dvě možnosti provedení zkoušky, přičemž obě jsou stejně přijatelné.

— Možnost A: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů a odeberou se k vyhodnocení na konci doby expozice.

— Možnost B: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

46. Na konci doby expozice v trvání 3–6 hodin se v monovrstvách mohou vyskytovat mitotické buňky (které se vyznačují okrouhlým tvarem a odchlipováním od povrchu). Jelikož lze tyto mitotické buňky snadno oddělit, mohou být při odstranění média obsahujícího zkoušenou látku ztraceny. Tyto buňky je třeba při promývání kultur shromáždit a vrátit je zpět, aby při odběru k vyhodnocení nedošlo ke ztrátě buněk, které se nacházejí ve fázi mitózy a jsou ohroženy vznikem mikrojader.

Počet kultur

47. Pro každou koncentraci zkoušené látky a v případě kultur s vehikulem/rozpouštědlem a kultur negativních kontrol je nutno použít duplicitní kultury. Pokud lze na základě předešlých laboratorních údajů prokázat minimální rozdíl mezi duplicitními kulturami, může být přijatelné použít jen po jedné kultuře. V případě použití vždy jen jedné kultury se doporučuje analyzovat zvýšený počet koncentrací.

Odběr buněk a příprava preparátů

48. Buňky z každé kultury se odebírají a zpracovávají zvlášť. Příprava buněk může zahrnovat hypotonizaci, ale tento krok není nutný, pokud se dosáhne odpovídajícího rozšíření buněk jiným způsobem. Při přípravě preparátů lze použít různé postupy za předpokladu, že zajistí získání vysoce kvalitních buněčných preparátů pro vyhodnocení. Cytoplazmu buněk je nutno uchovat, aby bylo možné provést detekci mikrojader a (v případě metody s blokováním cytokineze) spolehlivou identifikaci dvoujaderných buněk.

49. Preparáty lze barvit pomocí různých metod, jako je Giemsa nebo použití fluorescenční barviv se specifickou vazbou na DNA (59). Použitím barviva se specifickou vazbou na DNA (jako je např. akridinová oranž (61) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (62)) se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva bez specifické vazby na DNA. Jsou-li předmětem zájmu informace o mechanismu vzniku mikrojader, lze k identifikaci jejich obsahu (chromozom nebo chromozomální fragment) využít protilátky proti kinetochorům, hybridizační metodu FISH využívající pan-centromerické DNA-sondy, případně značení *in situ* pomocí primerů se specifickou pan-centromerickou vazbou spolu s vhodným kontrastním barvením DNA (15) (16). K rozlišení mezi klastogeny a aneugeny lze použít i jiné metody, pokud se ukázaly jako účinné.

Analýza

50. Všechny preparáty včetně preparátů s rozpouštědlem/vehikulem a preparátů kontrol by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle označeny kódem. Nebo lze kódované vzorky analyzovat za použití validovaného automatického systému pro průtokovou cytometrii nebo systému pro analýzu obrazu.

▼M3

51. V případě kultur ošetřených pomocí cytoB by se měla analyzovat četnost výskytu mikrojader nejméně u 2 000 dvoujaderných buněk pro každou koncentraci (nejméně u 1 000 dvoujaderných buněk z každé kultury; po dvou kulturách pro každou koncentraci). V případě použití vždy jen jedné kultury by se mělo z každé kultury vyhodnotit alespoň 2 000 dvoujaderných buněk pro každou koncentraci. Pokud je k dispozici k vyhodnocení pro každou koncentraci podstatně méně než 1 000 dvoujaderných buněk z každé kultury (respektive než 2 000, jestliže se použije jen jedna kultura) a není-li zjištěn výrazný nárůst výskytu mikrojader, musí se zkouška zopakovat za použití většího počtu buněk nebo při méně toxických koncentracích (podle toho, co z těchto dvou možností připadá v úvahu). Je třeba dbát na to, aby se nezapočítávaly dvoujaderné buňky, které mají nepravidelný tvar nebo jejichž dvě jádra se svou velikostí navzájem značně liší; také se nesmějí za dvoujaderné buňky mylně považovat nedostatečně rozšířené jednojaderné buňky. Buňky obsahující více než dvě hlavní jádra by se neměla analyzovat na přítomnost mikrojader, jelikož základní četnost mikrojader může být v těchto buňkách vyšší (63) (64). Započtení jednojaderných buněk je přijatelné, pokud se prokáže, že zkoušená látka narušuje působení cytoB.

52. U buněčných linií zkoušených bez ošetření cytochalasinem B by se měla vyhodnotit četnost mikrojader alespoň u 2 000 buněk pro každou koncentraci (alespoň u 1 000 buněk z každé kultury; po dvou kulturách pro každou koncentraci). Při použiti pouze jedné kultury pro každou koncentraci by se mělo vyhodnotit nejméně 2 000 buněk z dané kultury.

53. Při použití cytoB by se měla určit hodnota CBPI nebo RI k posouzení buněčné proliferace (viz dodatek 2) za použití nejméně 500 buněk z každé kultury. Když se expozice provádí bez přítomnosti cytoB, je nezbytné prokázat, že hodnocené buňky prodělaly proliferaci, jak je vysvětleno v odstavcích 24 až 27.

Kritéria přijatelnosti

54. Laboratoř, která navrhuje používání zkoušky MNvit popsané v této ZM, by měla prokázat svou schopnost spolehlivě a přesně detekovat chemické látky se známým aneugenním a klastogenním působením, při použití metabolické aktivace i bez ní, jakož i známé negativní látky za použití srovnávacích látek uvedených v dodatku 3. Svou schopnost správně provádět tuto ZM by měla laboratoř prokázat předložením důkazů, že buňky, u nichž vyhodnocuje tvorba mikrojader, prodělaly jedno jaderné dělení, pokud se zkouška provádí bez použití cytoB.

55. Jako srovnávací látky se doporučuje používat chemické látky uvedené v dodatku 3. Náhradní nebo další chemické látky lze rovněž používat, pokud jsou známy jejich účinky, pokud vyvolávají tvorbu mikrojader stejným mechanismem působení a pokud je prokázáno, že mají vztah k chemickým látkám, které se budou testovat za použití postupu MNvit. Součástí zdůvodnění může být validační studie využívající širokou škálu látek nebo zaměřená na užší spektrum na základě chemické třídy zkoušené látky nebo zkoumaného mechanismu vzniku poškození.

56. Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem a neošetřené kultury by měly poskytovat reprodukovatelně nízké a konzistentní četnosti mikrojader (obvykle 5–25 mikrojader na 1 000 buněk v případě druhů buněk uvedených v odstavci 11). Jiné druhy buněk mohou mít odlišné rozsahy odezvy, které by měly být stanoveny při validaci jejich používání v rámci zkoušky MNvit. Údaje z negativních kontrol, kontrol s rozpouštědlem a pozitivních kontrol by měly sloužit ke stanovení dosavadních kontrolních rozmezí. Tyto hodnoty by se měly použít při rozhodování o vhodnosti zařazení souběžných negativních nebo pozitivních kontrol do experimentu.

▼M3

57. Jsou-li pro provedení zkoušky navrhovány menší změny protokolu (např. použití automatizovaných namísto ručních postupů vyhodnocování, použití nového druhu buněk), je nutno prokázat účelnost této změny, nežli lze upravený protokol považovat za přijatelný k použití. Součástí prokázání účelnosti je důkaz, že lze zjistit hlavní mechanismy poškození chromozomů a zvýšení nebo snížení jejich počtu a že lze dosáhnout odpovídajících pozitivních i negativních výsledků u třídy jednotlivé látky nebo širokého spektra látek, které se mají testovat.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Zpracování výsledků

58. Pokud se používá technika blokování cytokineze, slouží k hodnocení indukce vzniku mikrojader jen četnost dvoujaderných buněk s mikrojádry (nezávisle na počtu mikrojader v každé buňce). Počítání buněk s jedním, dvěma nebo více mikrojádry by mohlo poskytnout užitečné informace, ale není povinné.

59. Souběžně by se mělo provádět měření cytotoxicity a/nebo cytostáze u všech ošetřených kultur a u kontrolních kultur s rozpouštědlem/vehikulem (58). Při použití metody s blokováním cytokineze, by se měly vypočítat hodnoty CBPI nebo RI u všech ošetřených a kontrolních kultur jako ukazatele zpoždění buněčného cyklu. V případě nepřítomnosti cytoB by se měly použít hodnoty RPD, RICC nebo PI (viz dodatek 2).

60. Je nutno uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.

61. Chemické látky, které vyvolávají vznik mikrojader při zkoušce MNvit, mají tento účinek proto, že vyvolávají poškození chromozomů, ztrátu chromozomů nebo kombinaci obou těchto dějů. Při určování, zda je mechanismus vyvolání tvorby mikrojader důsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení, lze uplatnit další analýzu za použití protilátek proti kinetochorům, sond *in situ* se specifickou vazbou na centromery nebo jiných metod.

Hodnocení a interpretace výsledků

62. Žádné ověření jednoznačně pozitivní nebo negativní odezvy pomocí dodatečné zkoušky není nutné. Nejednoznačné výsledky lze objasnit analýzou dalšího 1 000 buněk ze všech kultur, aby se zabránilo ztrátě zaslepení. Pokud tento přístup výsledek neobjasní, mělo by se provést další testování. Při následných experimentech by se mělo zvážit upravení parametrů studie u rozšířeného nebo zúženého rozsahu podmínek podle toho, co přichází v úvahu. Mezi parametry studie, které lze případně upravit, patří velikost kroku mezi jednotlivými zkušebními koncentracemi, načasování expozice a odběru buněk k vyhodnocení a/nebo podmínky metabolické aktivace.

63. Existuje několik kritérií pro stanovení pozitivního výsledku, například s koncentrací související nebo statisticky významné zvýšení počtu buněk obsahujících mikrojádra. Nejprve je nutno posoudit biologický význam výsledků. Při hodnocení významu biologické odpovědi může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu dosavadních hodnot kontrol. Při hodnocení výsledků zkoušky lze jako pomůcku použít vhodné statistické metody (65). Výsledky statistických testů je však třeba posuzovat s ohledem na závislost odezvy na dávku. V úvahu je nutno vzít také reprodukovatelnost a dosavadní údaje.

▼M3

64. Ačkoli většina experimentů poskytne jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v některých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o působení zkoušené látky. Tyto dvojznačné nebo sporné odezvy se mohou vyskytovat bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

65. Pozitivní výsledky zkoušky MNvit znamenají, že zkoušená látka vyvolává v kultivovaných savčích buňkách poškození nebo ztrátu chromozomů. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za použitých podmínek zkoušky nevyvolává poškození chromozomů a/nebo nárůst či pokles počtu kultivovaných savčích buněk.

Protokol o zkoušce

66. Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace, pokud jsou pro provedení studie významné:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje a registrační číslo CAS a číslo ES,

— skupenství a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provedení studie,

— reaktivita zkoušené látky s rozpouštědlem/vehikulem nebo médiem pro kultivaci buněk.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění výběru rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu.

Buňky:

— druh a zdroj použitých buněk,

— vhodnost použitého druhu buněk,

— nepřítomnost mykoplasmat, pokud připadá v úvahu,

— informace o trvání buněčného cyklu, době zdvojnásobení populace nebo proliferačním indexu,

— při použití lymfocytů je případně nutno uvést pohlaví, věk a počet dárců krve,

— při použití lymfocytů je nutno uvést, zda se exponuje plná krev nebo odstředěné lymfocyty,

— počet průchodů, pokud připadá v úvahu,

— metody udržování buněčných kultur, pokud připadá v úvahu,

— modální hodnota počtu chromozomů,

— běžné trvání buněčného cyklu (u negativní kontroly).

Zkušební podmínky:

— totožnost látky blokující cytokinezi (např. cytoB), pokud je použita, a její koncentrace a trvání expozice buněk,

— zdůvodnění volby koncentrací a počtu kultur včetně údajů o cytotoxicitě a omezeních rozpustnosti, jsou-li tyto informace k dispozici,

— složení média, případně koncentrace CO_2,

— hodnoty koncentrace zkoušené látky,

▼M3

— koncentrace (a/nebo objem) přidaného vehikula a zkoušené látky,

— teplota a doba inkubace,

— trvání expozice,

— doba od expozice do odběru buněk k vyhodnocení,

— hustota buněk při naočkování média, pokud připadá v úvahu,

— druh a složení metabolického aktivačního systému včetně kritérií přijatelnosti,

— látky použité jako pozitivní a negativní kontrola,

— metody přípravy preparátů a použitý postup barvení,

— kritéria pro identifikaci mikrojader,

— počty analyzovaných buněk,

— metody měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity,

— kritéria pro označení studií za pozitivní, negativní nebo dvojznačné,

— použité metody statistické analýzy,

— tam, kde je to vhodné, je nutno uvést rovněž metody (například využití protilátek proti kinetochorům), které slouží k určení, zda mikrojádra obsahují celé nebo rozlámané chromozomy.

Výsledky:

— použitý způsob měření cytotoxicity, např. CBPI nebo RI nebo v případě metody blokování cytokineze, respektive RICC nebo RPD nebo PI, pokud se metody blokování cytokineze nepoužívají, popřípadě jiné poznatky, např. konfluence buněk, apoptóza, nekróza, počítání metafází, četnost dvoujaderných buněk,

— známky precipitace,

— hodnoty pH a osmolality zkušebního média, pokud jsou zjištěny,

— vymezení přijatelných buněk pro analýzu,

— rozložení jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk, pokud se používá metoda blokování cytokineze,

— počet buněk s mikrojádry uvedený zvlášť u každé ošetřené a kontrolní kultury a případně určení, zda se jedná o dvoujaderné nebo jednojaderné buňky,

— pokud možno závislost odezvy na koncentraci,

— chemické údaje (koncentrace a rozpouštědla) souběžných negativních kontrol (s rozpouštědlem/vehikulem) a pozitivních kontrol,

— chemické údaje (koncentrace a rozpouštědla) dřívějších negativních kontrol (s rozpouštědlem/vehikulem) a pozitivních kontrol s uvedením rozsahů, střední hodnoty, směrodatné odchylky a intervalu spolehlivosti (např. 95 %),

— statistická analýza, případné p hodnoty.

Rozbor výsledků

Závěry

▼**M3**

LITERATURA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1–4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3–15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233–246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167–172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084–1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193–198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34–43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9–20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297–302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329–334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205–213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519–525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9–20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233–245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211–219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153–163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [www.oecd.org/env/testguidelines].

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13–36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37–60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61–87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88–124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125–152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187–208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45–59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81–116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183–190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55–71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137–163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123–134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569–580.

▼M3

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1–152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16–17 November, 2006, K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271–283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105–115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257–260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61–70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147–205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297–305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789–886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29–36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11–18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173–215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175–177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). K dispozici na adrese: [http://www.pops.int/].

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247–274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795–801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35–44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103–112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Res.*, 564, 97–100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61–65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1–3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169–184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191–201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269–275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65–75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463–467.

(66) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 850/2004 ze dne 29. dubna 2004 o perzistentních organických znečišťujících látkách a o změně směrnice 79/117/EHS (Úř. věst. L 229, 30.4.2004, s. 5).

▼M3

Dodatek 1

Definice

Aneugen: jakákoli látka nebo proces, který v interakci se složkami mitotického a meiotického cyklu buněčného dělení vede k aneuploidii v buňkách nebo organismech.

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Apoptóza: programovaná buněčná smrt, která se vyznačuje řadou kroků vedoucích k rozpadu buněk na membránově vázané části, které jsou poté odstraněny fagocytózou nebo rozkladem.

Buněčná proliferace: zvyšování počtu buněk v důsledku jejich mitotického dělení.

Centromera: oblast DNA v chromozomu, kde se stýkají obě chromatidy a k níž jsou bok po boku připojeny oba kinetochory.

Klastogen: jakákoli látka nebo proces, který způsobuje strukturální chromozomální aberace v populacích buněk nebo organismů.

Cytokineze: proces rozdělení buňky ihned po mitóze, čímž vzniknou dvě dceřiné buňky, z nichž každá obsahuje jedno jádro.

Proliferační index při blokování cytokineze (CBPI): podíl počtu buněk z druhého dělení v ošetřené populaci k jejich počtu v neošetřené kontrole (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytostáze: inhibice růstu buněk (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytotoxicita: škodlivé účinky na strukturu nebo funkci buňky, které nakonec způsobí její smrt.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, přestavby aduktů, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Interfázové buňky: buňky, které se nenacházejí ve stádiu mitózy.

Kinetochor: struktura obsahující proteiny, jež se vytváří u centromery chromozomu, na kterou se při dělení buněk napojují vlákna dělicího vřeténka, což umožňuje správný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitózy (meiózy) nereplikujícími se (lagging) chromozomovými fragmenty nebo celými chromozomy.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mitotický index: poměr buněk v metafázi vydělený celkovým počtem buněk zjištěných v populaci buněk; udává stupeň buněčné proliferace této populace.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomální aberace).

▼**M3**

Nondisjunkce: děj, při kterém se párové chromatidy nerozloučí a správně nerozdělí do vznikajících dceřiných buněk, což vede ke vzniku dceřiných buněk s abnormálními počty chromozomů.

Polyploidie: numerické chromozomální aberace v buňkách nebo organismech, které se týkají celé sady (celých sad) chromozomů, na rozdíl od jednoho chromozomu nebo jednotlivých chromozomů (aneuploidie).

Proliferační index (PI): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní nárůst počtu buněk (RICC): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní zdvojnásobení populace (RPD): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Replikační index (RI): podíl počtu dokončených cyklů buněčného dělení v ošetřené kultuře k jejich počtu v neošetřené kontrole během expoziční doby a obnovy kultury (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M3

Dodatek 2

Vzorce pro hodnocení cytotoxicity

1. *Při použití cytoB* by mělo být hodnocení cytotoxicity založeno na proliferačním indexu při blokování cytokineze (CBPI) nebo na replikačním indexu (RI) (16) (58). Hodnota CBPI udává průměrný počet buněčných cyklů na buňku v době jejího vystavení cytochalasinu B a lze ji použít k výpočtu proliferace buněk. Hodnota RI udává relativní počet jader v ošetřených kulturách ve srovnání s kontrolními kulturami a lze ji použít k výpočtu procenta cytostáze:

$$\% \text{ cytostáze} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

přičemž:

T = kultura ošetřená zkoušenou látkou

C = kontrolní kultura s vehikulem

kde:

$$CBPI = \frac{((\text{počet jednojaderných buněk}) + (2 \times \text{počet dvoujaderných buněk}) + (3 \times \text{počet vícejaderných buněk}))}{(\text{celkový počet buněk})}$$

Hodnota CBPI = 1 (všechny buňky jsou jednojaderné) tedy odpovídá 100 % cytostázi.

$$\text{Cytostáze} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{počet dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{počet vícejaderných buněk})) \div (\text{celkový počet buněk})_T}{((\text{počet dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{počet vícejaderných buněk})) \div (\text{celkový počet buněk})_C} \times 100$$

T = ošetřené kultury

C = kontrolní kultury

2. Hodnota RI = 53 % tedy znamená, že v porovnání s počtem buněk, z nichž v kontrolní kultuře vznikly rozdělením dvoujaderné a vícejaderné buňky, se v ošetření kultuře rozdělilo pouze 53 % tohoto počtu, což znamená 47 % cytostázi.

3. *Když se cytoB nepoužije*, doporučuje se hodnotit cytotoxicitu na základě relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo relativního zdvojnásobení populace (RPD) (58), jelikož oba tyto ukazatele zohledňují poměr buněčné populace, která se rozdělila.

$$RICC = \frac{(\text{zvýšení počtu buněk v ošetřených kulturách (konečný stav – počáteční stav)})}{(\text{zvýšení počtu buněk v kontrolních kulturách (konečný stav – počáteční stav)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{počet zdvojnásobení populace v ošetřených kulturách})}{(\text{počet zdvojnásobení populace v kontrolních kulturách})} \times 100$$

▼**M3**

kde:

Zdvojnásobení populace = [log (počet buněk po ošetření ÷ počáteční počet buněk)] ÷ log 2

4. Hodnota RICC nebo RPD ve výši 53 % tedy znamená 47 % cytotoxicitu/cytostázi.

5. Za použití indexu proliferace (PI) lze posoudit cytotoxicitu spočítáním klonů tvořených 1 buňkou (cl1), 2 buňkami (cl2), 3 až 4 buňkami (cl4) a 5 až 8 buňkami (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Hodnota PI se používá jako cenný a spolehlivý parametr cytotoxicity i pro buněčné linie kultivované *in situ* bez přítomnosti cytoB (25) (26) (27) (28).

▼**M3**

Dodatek 3

Srovnávací látky doporučené pro hodnocení funkčnosti ([1])

Kategorie	Chemická látka	Číslo CAS	Číslo ES
1. Klastogeny působící bez metabolické aktivace			
	cytarabin	147-94-4	205-705-9
	mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeny vyžadující metabolickou aktivaci			
	benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeny			
	kolchicin	64-86-8	200-598-5
	vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negativní látky			
	bis(2-ethylhexyl)ftalát	117-81-7	204-211-0
	kyselina nalidixová	389-08-2	206-864-7
	pyren	129-00-0	204-927-3
	chlorid sodný	7647-14-5	231-598-3

([1]) Srovnávací látky jsou chemické látky doporučené k použití. Chemické látky uvedené v seznamu srovnávacích látek je možno nahradit jinými látkami nebo lze do seznamu doplnit další látky, pokud jsou známy jejich účinky a pokud vyvolávají tvorbu mikrojader stejným mechanismem působení a pokud je prokázáno, že mají vztah k chemickým látkám, které se budou testovat za použití postupu MNvit. V závislost na účelu může být součástí zdůvodnění také validační studie využívající širokou škálu látek nebo zaměřená na užší spektrum na základě chemické třídy zkoušené látky nebo zkoumaného mechanismu vzniku poškození.

▼M3

B.50 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: DA

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2)(3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Metoda LLNA: DA (kterou vyvinula firma Daicel Chemical Industries, Ltd.) je neradioaktivní modifikací metody LLNA, která kvantifikuje obsah adenosintrifosfátu (ATP) prostřednictvím bioluminiscence, jež slouží jako indikátor proliferace lymfocytů. Zkušební metoda LLNA: DA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12) (13). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (14). Zkušební metoda LLNA (podle kapitoly B.42 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 429 a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA DA (podle kapitoly B.50 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 A) a metoda LLNA: BrdU-ELISA (podle kapitoly B.51 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 B) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.

2. Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: DA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivitě při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14).

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkušební metoda LLNA: DA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: DA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 (14); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před

▼M3

provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: DA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: DA (viz odstavec 5)), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA: DA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14). Kromě toho metoda LLNA: DA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: DA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: DA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (14), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406 (14) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (16). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: DA (10). Použití metody LLNA: DA navíc nemusí být vhodné pro zkoušení látek, které ovlivňují hladiny ATP (např. látek, jež působí jako inhibitory ATP), nebo látek, které ovlivňují přesnost měření intracelulárního ATP (např. přítomnost enzymů snižujících hladinu ATP nebo přítomnost extracelulárního ATP v lymfatických uzlinách). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: DA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: DA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,8 do 2,5 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 44 látek za použití hodnot SI ≥ 1,8 (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: DA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala tři z 12 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,8 do 2,5 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

6. Základní podstata metody LLNA: DA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index

▼M3

stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být ≥ 1,8, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu ATP za použití bioluminescence (o níž je známo, že její intenzita je úměrná počtu živých buněk) 17) k indikaci zvýšeného počtu proliferujících buněk lymfatických uzlin drenujících aurikulární oblast (18) (19). Bioluminescenční metoda využívá enzym luciferázu ke katalyzaci tvorby světla z ATP a luciferin v rámci této reakce:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná koncentraci ATP a měří se pomocí luminometru. Zkouška založená na použití luciferinu a luciferázy je citlivou metodou pro určení množství ATP, která se používá k široké škále účelů (20).

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: DA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/J, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (12) (13). Používají se mladé dospělé samice myší, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: DA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (21), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

▼M3

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: DA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: DA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 1,8 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 10 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: DA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: DA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: DA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (22).

▼M3

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (23). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

16. V případech, kdy se hodnotí látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA: DA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (24). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (24) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejný přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

▼M3

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (22). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: DA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: DA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: DA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 8) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 7 (24 hodin před ukončením) a v den 8. Kromě toho lze v den 8 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: DA zvolí nejbližší nižší dávka v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18), která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2

▼M3

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30) (31) (32) (33) (34).

24. O systémové toxicitě (35) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: DA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 8 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humánně usmrtit (36).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se čtyřmi až pěti tahy štětečku namočeného do 1 % vodného roztoku natrium-dodecyl-sulfátu (SLS) nanese tento roztok tak, aby pokryl celou plochu hřbetu ucha. Jednu hodinu po nanesení roztoku SLS se na hřbet každého ucha aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).

— *Den 2, den 3 a den 7:* Zopakuje se postup předběžného ošetření 1 % vodným roztokem SLS a nanesení zkoušené látky provedený v den 1.

— *Den 4, den 5 a den 6:* Žádná aplikace.

— *Den 8:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 až 30 hodin po zahájení aplikace v den 7 se zvířata humánně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufrovém fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (22). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

▼M3

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví tak, že se lymfatické uzliny vloží mezi dvě podložná sklíčka a lehkým tlakem se rozdrtí. Po potvrzení, že je tkáň rozprostřena v tenké vrstvě, se sklíčka odtáhnou od sebe. Tkáně z obou sklíček se suspendují v roztoku PBS tak, že se každé sklíčko podrží nakloněné nad Petriho miskou a oplachuje se roztokem PBS při současném seškrabování tkáně ze sklíčka stěrkou na buňky. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. K opláchnutí obou sklíček by se měl použít celkový objem 1 ml PBS. Suspenzi buněk lymfatických uzlin je nutno v Petriho misce zlehka homogenizovat stěrkou na buňky. Mikropipetou se pak nabere 20μL poměrný díl suspenze buněk z lymfatických uzlin – přičemž je třeba nenabrat membránu, která je viditelná pouhým okem – a následně se smísí s 1,98 ml PBS, abychom dostali 2 ml vzorku. Druhý vzorek o objemu 2 ml se pak připraví stejným způsobem, aby vzniky od každého zvířete dva vzorky.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu ATP v lymfocytech)

27. Zvýšení obsahu ATP v lymfatických uzlinách se zjišťuje metodou, která je založena na použití luciferinu a luciferázy, za pomoci soupravy pro měření obsahu ATP, která měří bioluminescenci v relativních jednotkách luminiscence (RLU). U všech jednotlivých zvířat je nutno dodržet stejnou dobu od usmrcení do změření obsahu ATP, která by měla činit přibližně 30 minut, protože se má za to, že obsah ATP postupně klesá v závislosti na době uplynulé od usmrcení zvířete 12). Proto je nutno celou řadu úkonů od vynětí aurikulárních lymfatických uzlin až do změření obsahu ATP dokončit do 20 minut podle předem stanoveného harmonogramu, který je u každého zvířete stejný. Luminescenci ATP je nutno změřit u každého 2 ml vzorku, takže se získají dvě hodnoty ATP za každé zvíře. Pak se určí průměrná luminescence ATP, která se použije v následných výpočtech (viz odstavec 30).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (36).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty RLU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty RLU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

▼M3

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota SI ≥ 1,8 10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,8 do 2,5) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (2) (3) (37).

32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,8 do 2,5 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami RLU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou RLU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

▼M3

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy pro měření obsahu ATP, které se týkají prokazování a kontroly kvality,

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— doba usmrcení a doba změření množství ATP u každého zvířete,

— tabulka hodnot RLU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu,

— průměrná hodnota RLU na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu,

▼M3

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem, Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem, Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 11–26.

(14) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Meth., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. J. Immunol. Meth., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. Biomat., 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. Meth. Enzymol., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(36) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ. Health, 53 563–79.

(38) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkot shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (38).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (38).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (38).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (38).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M3

B.51 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: BRDU-ELISA

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1 a kapitola B.42 této přílohy). Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] je neradioaktivní modifikace zkušební metody LLNA, která k měření proliferace lymfocytů využívá neradioaktivně značený 5-brom-2-deoxyuridin (BrdU) (Reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) v rámci systému založeném na zkoušce ELISA. Metoda LLNA: BrdU-ELISA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní vědeckou komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA (kapitola B.42 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 429) a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 B) a metoda LLNA: DA (kapitola B.50 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 A) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (13), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.

2. Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: BrdU-ELISA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivitě při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13).

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: BrdU-ELISA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další

▼M3

potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: BrdU-ELISA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: BrdU-ELISA [viz odstavec 5]), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13). Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty, která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (podle kapitoly B.6 této přílohy) (13). Díky tomu metoda LLNA: BrdU-ELISA snižuje utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: BrdU-ELISA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. zkoušení některých kovů, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (15). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: BrdU-ELISA (10). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: BrdU-ELISA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: BrdU-ELISA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,6 do 1,9 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 43 látek za použití hodnot SI $\geq$ 1,6 (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: BrdU-ELISA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala dvě z 11 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,6 do 1,9 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

6. Základní podstata metody LLNA: BrdU-ELISA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index

▼M3

stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být ≥ 1,6, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu BrdU k indikaci zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. Látka BrdU je analogem thymidinu a začleňuje se podobným způsobem do DNA proliferujících buněk. Začlenění BrdU se měří metodou ELISA, která využívá protilátku specifickou pro BrdU, která je rovně značí peroxidázou. Po přidání substrátu peroxidáza reaguje se substrátem při vzniku barevného produktu, jehož množství se určuje při určité absorbanci za použití čtečky mikrotitračních destiček.

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: BrdU-ELISA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/JN, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (10) (12). Používají se mladé dospělé samice myší, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: BrdU-ELISA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (16), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit

▼M3

vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: BrdU-ELISA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: BrdU-ELISA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 1,6 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 14 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (č. CAS 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: BrdU-ELISA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: BrdU-ELISA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: BrdU-ELISA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (17).

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (18). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

▼M3

16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA: BrdU-ELISA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrolní skupina (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (19). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (19) (20 a kapitola B.4 této přílohy). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejný přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

▼M3

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi zkoušenou látkou a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (17). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: BrdU-ELISA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by měla být 100 % koncentrace zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: BrdU-ELISA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (20 a kapitola B.4 této přílohy). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (21) (22). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2

▼M3

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (21) (22) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (25) (26) (27) (28) (29).

24. O systémové toxicitě (30) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humánně usmrtit (31).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11 až 15).

— *Den 2 a den 3:* Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

— *Den 4:* Žádná aplikace.

— *Den 5:* Injekčně se intraperitoneálně aplikuje 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

— *Den 6:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 hodin (24 hod.) po injekčním podání BrdU se zvířata humánně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufrovém fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (17). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

▼M3

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 μm sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze (např. rozdrcením lymfatických uzlin za použití jednorázové plastové paličky a následným protlačením tkáně nylonovým sítkem # 70). Postup přípravy suspenze buněk z lymfatických uzlin je v této zkoušce rozhodující, a proto by si měl každý pracovník osvojit tuto dovednost předem. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. V každém případě je nutno cílový objem suspenze buněk z lymfatických uzlin upravit na stanovený optimální objem (přibližně 15 ml). Optimální objem je založen na dosažení průměrné absorbance negativní kontrolní skupiny v rozmezí 0,1–0,2.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu BrdU v DNA lymfocytů)

27. Obsah BrdU se měří metodou ELISA za použit komerční soupravy (např. Roche Applied Science, Mannheim, Německo, katalogové číslo 11 647 229 001). Postup lze stručně popsat tak, že 100 ml suspenze buněk z lymfatických uzlin se nakape do jamek tří mikrotitračních destiček s plochým dnem. Po fixaci a denaturaci buněk z lymfatických uzlin se do každé jamky přidá protilátka proti BrdU a obsah jamek se nechá zreagovat. Následně se protilátka proti BrdU odstraní vymytím, přidá se roztok substrátu a nechá se vzniknout chromogen. Pak se změří absorbance při vlnové délce 370 nm s referenční vlnovou délkou 492 nm. Ve všech případech je nutno optimalizovat zkušební podmínky (viz odstavec 26).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (31).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

Index značení BrdU je definován jako:

$$\text{Index značení BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

kde: em = vlnová délka záření; ref = referenční vlnová délka.

▼M3

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota SI ≥ 1,6 (10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,6 do 1,9) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (3) (6) (32).

32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,6 do 1,9 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito body a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami indexu značení BrdU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou indexu značení BrdU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

▼M3

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy ELISA, které se týkají prokazování a kontroly kvality (citlivost a specifičnost detekce protilátek a mez detekce),

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného humánního usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— tabulka hodnot indexu značení BrdU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu;

— průměrná hodnota indexu značení BrdU na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu,

▼M3

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (33).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní (33).

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní (33).

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejné zkoušené látky získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (33).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (33).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (33).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M4

B.52 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 436 (2009). První pokyny k akutní inhalační toxicitě TG 403 byly schváleny v roce 1981 a od té doby byly revidovány (viz kapitola B.2 této přílohy (1)). Po schválení revidované metody stanovení třídy akutní toxicity (ATC) u orální toxicity (kapitola B.1 *tris* této přílohy) (5) se považovalo za vhodné vyvinout metodu ATC u inhalační toxicity (2), (3), (4). Retrospektivní zhodnocení funkčnosti zkušební metody ATC pro akutní inhalační toxicitu prokázalo, že je tato metoda vhodná pro použití k účelům klasifikace a označení (6). Inhalační ATC zkušební metoda umožní použít sérii kroků o fixních cílových koncentracích k získání klasifikace toxicity zkoušené chemické látky. Jako základní cílový parametr se používá letalita, nicméně zvířata trpící závažnou bolestí nebo strádáním, utrpením či blížícím se uhynutím by se měla humánním způsobem utratit, aby se minimalizovalo jejich utrpení. Pokyny k humánním cílovým parametrům jsou k dispozici v Pokynech OECD č. 19 (7).

2. Pokyny k provádění a interpretaci této zkušební metody naleznete v pokynech č. 39 – Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39) (8).

3. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete v dodatku 1 a v GD 39 (8).

4. Tato zkušební metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařadit a klasifikovat zkoušenou chemickou látku podle nařízení (ES) č. 1272/2008 pro klasifikaci chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (9). V případě, že jsou zapotřebí bodové odhady hodnot LC_{50} nebo analýzy odezvy na koncentraci, je vhodnou zkušební metodou, která by se měla použít, kapitola B.2 této přílohy (1). Další pokyny k výběru zkušební metody naleznete v dokumentu GD 39 (8). Tato zkušební metoda není výslovně určena pro zkoušky speciálních materiálů, jako jsou špatně rozpustné izometrické nebo vláknité materiály či vyráběné nanomateriály.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Před zamýšlením provést zkoušky v souladu s touto zkušební metodou by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, včetně stávajících studií, jejichž výsledky by podpořily neprovádění dalších zkoušek, aby se minimalizovalo použití zvířat. Informace, které mohou pomoci při výběru nejvhodnějších druhů, kmenů, pohlaví, způsobu expozice a vhodných zkušebních koncentrací, se týkají identity, chemické struktury a fyzikálně-chemických vlastností zkoušené chemické látky, výsledků jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaného použití a potenciální expozice u člověka, dostupných údajů (Q)SAR a toxikologických údajů o strukturně příbuzných chemických látkách. Koncentrace, u nichž se očekává, že způsobí intenzivní bolest a utrpení vzhledem k žíravým ([1]) nebo silně dráždivým účinkům, by se neměly touto zkušební metodou testovat [viz GD 39 (8)].

([1]) Vyhodnocení žíravosti by se mělo zakládat na odborném posudku s použitím např. těchto podkladů: zkušenosti u člověka a zvířat, stávající (in vitro) údaje, např. kapitola B.40 (10), B.40 bis (11) této přílohy nebo OECD TG 435 (12), hodnoty pH, informace o podobných chemických látkách nebo jakékoli jiné relevantní údaje.

▼M4

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Podstatou zkoušky je, že se pomocí postupu prováděného po krocích získají dostatečné informace o akutní inhalační toxicitě zkoušené chemické látky během 4hodinového období expozice, které umožní její klasifikaci. Pro specifické regulační účely mohou být použity i jiné doby trvání expozice. V každém kroku s definovanou koncentrací se testují 3 zvířata od každého pohlaví. V závislosti na mortalitě a/nebo stavu agónie zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené chemické látky rozhodnout průměrně na základě 2 kroků. Jsou-li k dispozici důkazy, že je jedno pohlaví citlivější než druhé, pak je možné ve zkoušce pokračovat pouze s citlivějším pohlavím. Výsledek předchozího kroku určí následující krok tak, že:

   a) nebudou nutné žádné další zkoušky;

   b) provede se zkouška u tří zvířat od každého pohlaví, nebo

   c) provede se zkouška se 6 zvířaty pouze citlivějšího pohlaví, tj. nižší mezní odhady toxické třídy by se měly zakládat na 6 zvířatech v každé skupině se zkoušenou koncentrací, bez ohledu na pohlaví.

7. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, by se měla humánně utratit a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů č. 19 o humánních cílových parametrech (7).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

8. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Upřednostňovaným druhem je potkan, a pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

9. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den expozice by mělo jít o mladé dospělé jedince ve stáří 8 až 12 týdnů a jejich tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti pro každé pohlaví již dříve exponovaných zvířat stejného stáří. Zvířata jsou náhodně vybrána a označena pro potřeby individuální identifikace. Zvířata se umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky. Zvířata by se také měla nechat po krátkou dobu před zahájením zkoušky zvyknout na zkušební zařízení, neboť to sníží stres způsobený novým prostředím.

Zvířecí chov

10. Teplota zkušební místnosti, v níž se uchovávají zvířata, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být možné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na omezující trubičky. Omezující trubičky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Zábrana může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo minutový dechový objem. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující

▼M4

trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkouseného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Inhalační komory

11. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i výrazy pouze-hlava, pouze-nos, pouze-čenich). Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (8).

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

12. Doporučuje se fixní doba expozice čtyři hodiny, nepočítaje v to dobu potřebnou k dosažení rovnováhy. K splnění specifických požadavků mohou být třeba jiné délky trvání expozice, avšak mělo by se pro ně uvést zdůvodnění ve zprávě o studii [viz GD 39 (8)]. Zvířata vystavená látce v komorách pro celotělovou expozici by se měla držet odděleně, aby se zabránilo požření zkoušené látky při vzájemné péči o srst s ostatními zvířaty v kleci. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

13. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací.

Distribuce velikosti částic

14. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení velikosti částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 4 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (8), (13), (14). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba poskytnout odborný posudek. Například kovové výpary mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice, vlákna a hygroskopické materiály (které ve vlhkém prostředí dýchacích cest nabývají na velikosti) mohou tuto normu překročit.

▼M4

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

15. K dosažení vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky v ovzduší lze použít nosič. Zpravidla by se měla dávat přednost vodě. Částicový materiál se může zpracovat mechanickými postupy, aby se dosáhlo požadované distribuce velikosti částic, avšak mělo by se zajistit, že nedojde k rozkladu nebo přeměně zkoušené chemické látky. Domníváteli se, že mechanické postupy změnily chemické složení zkoušené látky (např. extrémně vysoká teplota v důsledku frikce při intenzivním mletí), mělo by se složení zkoušené chemické látky ověřit analyticky. Je třeba dostatečně zabezpečit, aby nedošlo ke kontaminaci zkoušené chemické látky. Nedrolivé zrnité materiály, které jsou záměrně zformulovány tak, aby je nebylo možno vdechnout, není třeba zkoušet. K prokázání skutečnosti, že při manipulaci se zrnitým materiálem nevznikají vdechovatelné částice, by se měla použít zkouška otěru. Pokud při zkoušce otěru vzniknou vdechovatelné částice, měla by se provést zkouška inhalační toxicity.

Kontrolní zvířata

16. Souběžná negativní (vystavena pouze vzduchu) kontrolní skupina není nutná. Používá-li se k vytvoření zkušební atmosféry jiný nosič než voda, měla by se kontrolní skupina s nosičem použít pouze tehdy, nejsou-li k dispozici historické údaje o inhalační toxicitě nosiče. Jestliže studie toxicity zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a kontrola s nosičem tudíž není nutná.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

17. Proudění vzduchu komorou by se mělo pečlivě řídit, neustále sledovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech při každé expozici. Monitorování koncentrace látky ve zkušební atmosféře (nebo stability) je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek k řízení všech důležitých parametrů generování dynamické atmosféry. V komorách určených k expozici pouze nazální cestou by se měl brát zvláštní ohled na to, aby se zamezilo opětovnému vdechování, v případech, kdy proudění vzduchu expozičním systémem není dostačující k zajištění dynamického proudění zkušební chemické atmosféry. Existují předepsané metodiky, které lze použít k prokázání skutečnosti, že za vybraných provozních podmínek nedochází k opětovnému vdechování (8), (15). Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

18. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v zóně, kde zvířata dýchají, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla sledovat a zaznamenat alespoň třikrát při trvání expozice až 4 hodiny a každou hodinu při kratších expozicích. Relativní vlhkost by se měla v ideálním případě udržovat v rozmezí 30 až 70 %, to však nemusí být proveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo ji nemusí být možné změřit v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

▼M4

Zkoušená chemická látka: nominální koncentrace

19. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím komorovým systémem. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: skutečná koncentrace

20. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky v zóně, kde zvířata dýchají, v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze. Ve zprávě o studii by se měly uvést cílové, nominální a skutečné koncentrace, avšak k výpočtu hodnot letální koncentrace ve statistických analýzách se použijí pouze skutečné koncentrace.

21. Měla by se použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za podmínek, které udržují jeho čistotu, homogenitu a stabilitu. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných kontaminujících látek a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní šířka píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, bývá rozumné, ověřit si charakterizaci látky poskytnutou zadavatelem, a sice alespoň omezeným způsobem (např. barva, fyzikální povaha atd.).

22. Expoziční atmosféra by se měla udržovat co možná nejstálejší a měla by se monitorovat buď nepřetržitě, nebo v pravidelných intervalech v závislosti na analytické metodě. Používá-li se odběr vzorků v pravidelných intervalech, měly by se vzorky atmosféry v komoře odebrat ve čtyřhodinové studii alespoň dvakrát. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, může se během celého období expozice odebrat jeden vzorek. Objeví-li se výrazné výkyvy mezi jednotlivými vzorky, měly by se u dalších zkoušených koncentrací použít čtyři vzorky na každou expozici. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba trvání expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována, a ta bere v úvahu dobu nutnou k dosažení t_{95}. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (8).

▼M4

23. U vysoce komplexních směsí složených z par/plynů a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře odlišně, proto by se pro každou fázi (pára/plyn a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo složky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (8).

Zkoušená chemická látka: distribuce velikosti částic

24. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla během čtyřhodinové expozice stanovit alespoň dvakrát pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic. Je-li možné prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (8)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat expozici. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází (viz odstavec 14).

POSTUP

Hlavní zkouška

25. Pro každý krok se použijí tři zvířata od každého pohlaví nebo šest zvířat citlivějšího pohlaví. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby trvání expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Úroveň koncentrace, která se má použít jako počáteční dávka, se vybere z jedné ze čtyř fixních úrovní, přičemž by počáteční úroveň koncentrace měla být ta, jež u některých z exponovaných zvířat nejpravděpodobněji způsobí toxicitu. Schémata zkoušek pro plyny, páry a aerosoly (zahrnutá v dodatcích 2–4) představují zkoušky s mezními hodnotami pro kategorie 1–4 dle nařízení CLP (9) pro plyny (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (dodatek 2), pro páry (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (dodatek 3) a pro aerosoly (0,05, 0,5, 1,5 mg/l/4 h) (dodatek 4). Kategorie 5, která není v nařízení (ES) č. 1272/2008 zavedena (9), se týká koncentrací přesahujících příslušné mezní koncentrace. Pro každou počáteční koncentraci se používá příslušné schéma zkoušky. Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat, dokud není možné provést kategorizaci.

26. Časový interval mezi exponovanými skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. S expozicí zvířat další úrovni koncentrace by se mělo vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve zkoušená zvířata přežila. Mezi jednotlivými expozicemi na každé úrovni koncentrace se doporučuje ponechat dobu tří nebo čtyř dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné odezvy.

▼M4

Limitní zkouška

27. Limitní zkouška se používá v případě, že je o zkoušené chemické látce známo nebo se o ní předpokládá, že je prakticky netoxická, tj. vyvolává toxickou reakci pouze při koncentraci vyšší, než je regulační mezní koncentrace. Informace o toxicitě zkoušené chemické látky lze získat ze znalostí o podobných zkoušených látkách či podobných směsích, vezme-li se v úvahu identita a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušená chemická látka bude toxická, by se měla provést hlavní zkouška [další pokyny naleznete v dokumentu GD 39 (8)].

28. Při použití obvyklého postupu se tři zvířata od každého pohlaví nebo šest zvířat citlivějšího pohlaví vystaví koncentracím 20 000 ppm u plynů, 20 mg/l u par a 5 mg/l u prachů/mlh (jsou-li dosažitelné), což slouží jako limitní zkouška pro tuto zkušební metodu. Při zkoušení aerosolů by mělo být primárním cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (tj. MMAD = 1–4 μm). U většiny zkoušených chemických látek toho lze dosáhnout při koncentraci 2 mg/l. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze tehdy, lze-li dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (8)]. V souladu s GHS (16) se nedoporučuje provádět zkoušky při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. O zkoušce v GHS kategorii 5 (16), která není zavedena v nařízení (ES) č. 1272/2008 (9), by se mělo uvažovat pouze v případě, existuje-li velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, a ve zprávě ze studie se uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba se pečlivě vyvarovat podmínek příznivých pro explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před limitní zkouškou provést jedna zkouška bez zvířat, aby se zajistilo, že lze v komoře dosáhnout podmínek pro limitní zkoušku.

POZOROVÁNÍ

29. Během období expozice by se měla zvířata často klinicky sledovat. Po expozici by se měla v den expozice provést klinická pozorování alespoň dvakrát nebo častěji, pokud to naznačuje odezva zvířat na expozici a poté alespoň jednou denně po dobu celkem 14 dní. Délka období sledování není fixní, nýbrž by se měla určit na základě povahy a doby nástupu klinických příznaků a délky období zotavení. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity. Všechna sledování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou zvlášť pro každé zvíře. Umírající zvířata a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení by se měla humánně utratit z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. Při vyšetřování klinických příznaků toxicity je třeba dbát na to, aby se počáteční špatný stav a přechodné respirační změny v důsledku postupu expozice neinterpretovaly mylně jako účinky spojené se zkoušenou chemickou látkou. Měly by se vzít v úvahu principy a kritéria shrnuté v dokumentu o humánních parametrech (7). Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

▼M4

30. Pozorování v kleci se soustřeďují na změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je-li to možné, měly by se zaznamenat jakékoli rozdíly mezi místními a systémovými účinky. Pozornost je třeba věnovat pozorování tremoru, křečí, slinění, průjmu, letargie, spánku a kómatu. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci.

Tělesné hmotnosti

31. Hmotnosti jednotlivých zvířat by se měly zaznamenat jednou během období aklimatizace, v den expozice před expozicí (den 0) a minimálně 1., 3. a 7. den (a poté jednou týdně) a v době uhynutí nebo utracení, pokud k němu dojde po dni 1. Tělesná hmotnost je uznávaná jako zásadní ukazatel toxicity a zvířata vykazující přetrvávající úbytek hmotnosti $\geq$ 20 % v porovnání s hodnotami před studií by se měla pečlivě sledovat. Na konci období po expozici se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

Patologie

32. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu zajištění dobrého zacházení se zvířaty, by se měla podrobit pitvě. Není-li možno pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotách dostatečně nízkých k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

33. Další vyšetření zahrnutá *a priori* v návrhu lze zvážit za účelem rozšíření interpretační hodnoty studie, např. měření hmotnosti plic přeživších potkanů a/nebo poskytnutí důkazů o podráždění pomocí mikroskopického vyšetření dýchacích cest. Mezi vyšetřované orgány mohou patřit ty, které vykazují makroskopické patologické známky u zvířat přežívajících po 24 či více hodin a orgány, o nichž je známo nebo se očekává, že budou postiženy. Mikroskopické vyšetření celých dýchacích cest může poskytnout užitečné informace u zkoušených chemických látek, které reagují s vodou, například u kyselin a hygroskopických zkoušených materiálů.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

34. Měly by se uvést údaje o tělesné hmotnosti a pitevních nálezech pro každé jednotlivé zvíře. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

▼M4

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, světelné období a druh stravy,

— použitý druh/kmen a odůvodnění použití jiného druhu než potkana,

— počet, věk, a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně stravy, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a číslo v registru Chemical Abstract Services (CAS), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud se nepoužije voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně jejích rozměrů a objemu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení pro měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu, úprava dodávaného/odsávaného vzduchu a systém použitý pro klimatizaci,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (nazální expozice), umístění zvířat v systému (celotělová expozice),

— homogenita/stabilita zkušební atmosféry v čase,

— umístění teplotních čidel a čidel vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— informace o zařízení použitém k měření kyslíku a oxidu uhličitého, používá-li se,

▼M4

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95}),

— počet změn objemu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění výběru cílové koncentrace v hlavní studii,

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U zkoušených směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět v hmotnostních jednotkách (např. mg/l, mg/m^3, atd.), v závorce lze uvést také hodnotu v objemových jednotkách (např. ppm, ppb),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky. V případě, kdy mohly mechanické postupy změnit chemické složení zkoušené látky, uveďte také výsledky analýz ověřujících složení zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno obsahující nákres) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o reakci a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity, včetně mortality, charakteru, závažnosti a trvání účinků),

— hmotnosti jednotlivých zvířat naměřené ve dnech studie, datum a čas uhynutí, pokud k němu došlo před plánovaným utracením, časový průběh nástupu příznaků toxicity a zda byly vratné u každého ze zvířat,

▼M4

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— klasifikační kategorie dle nařízení CLP a mezní hodnota LC_{50}.

Diskuse a interpretace výsledků

— měl by se klást zvláštní důraz na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možno splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých k stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo místní),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v dokumentu OECD o humánních parametrech (7).

LITERATURA:

1) Kapitola B.2 této přílohy, Akutní toxicita (inhalační).

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

5) Kapitola B.1 tris této přílohy, Akutní orální toxicita - metoda stanovení třídy akutní toxicity.

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

10) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška transkutánního elektrického odporu (TER).

11) Kapitola B.40 bis této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška pomocí modelu lidské kůže.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Dostupné na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 2

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u plynů (ppm/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 2a: Výchozí koncentrace je 100 ppm

Dodatek 2b: Výchozí koncentrace je 500 ppm

Dodatek 2c: Výchozí koncentrace je 2 500 ppm

Dodatek 2d: Výchozí koncentrace je 20 000 ppm

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

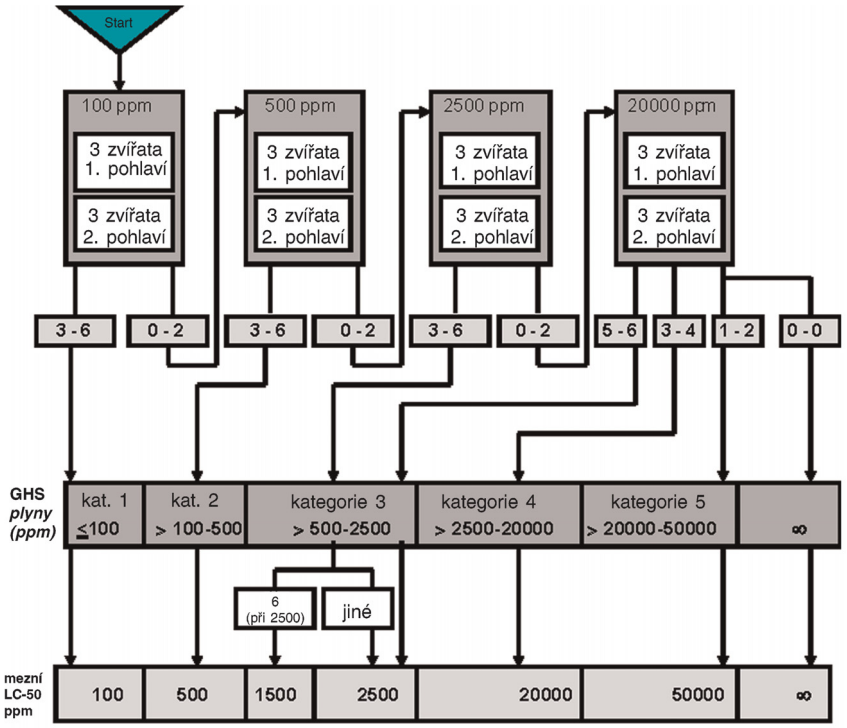
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼M4

Dodatek 2a

Testy akutní toxicity:

Zkušební postupy s výchozí koncentrací plynů 100 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: neklasifikováno

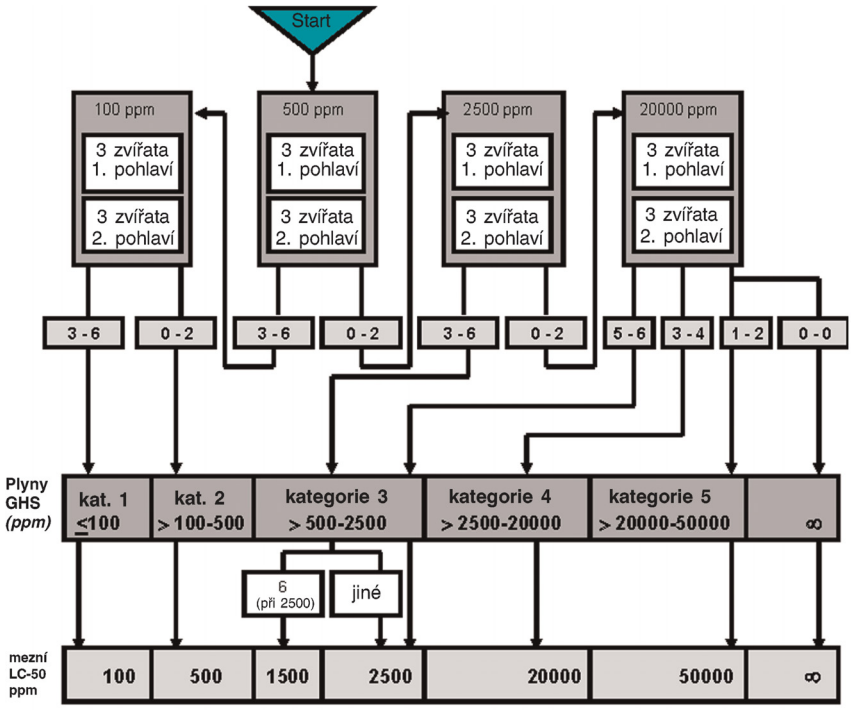
— zkoušeno při = 20 000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 500 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmonizovaný systém klasifikace a označov ání chemických látek

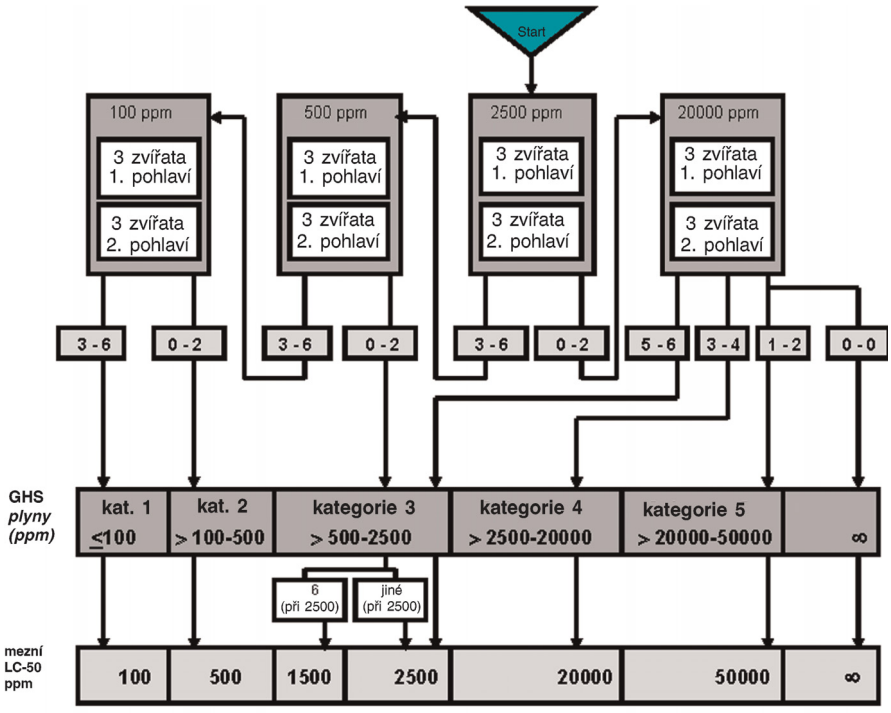
— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 2 500 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

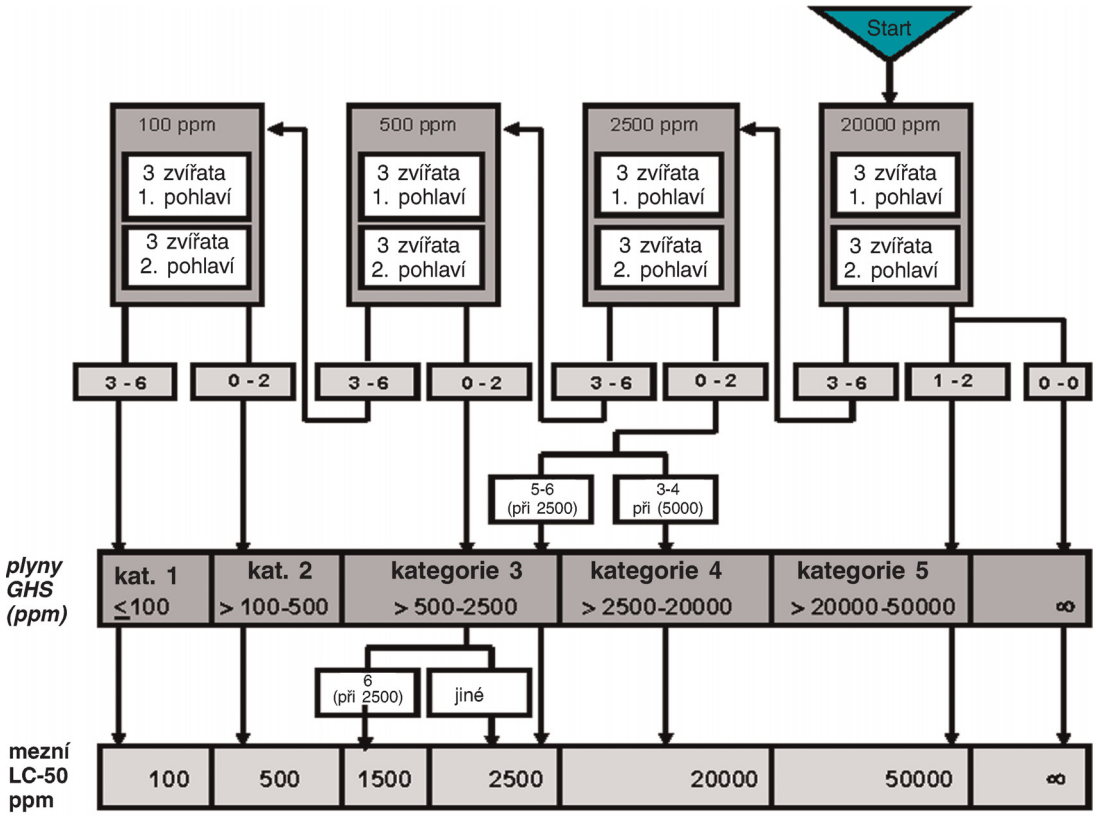
— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 20 000 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u par (mg/1/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 3a: Výchozí koncentrace je 0,5 mg/l

Dodatek 3b: Výchozí koncentrace je 2,0 mg/l

Dodatek 3c: Výchozí koncentrace je 10 mg/l

Dodatek 3d: Výchozí koncentrace je 20 mg/l

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

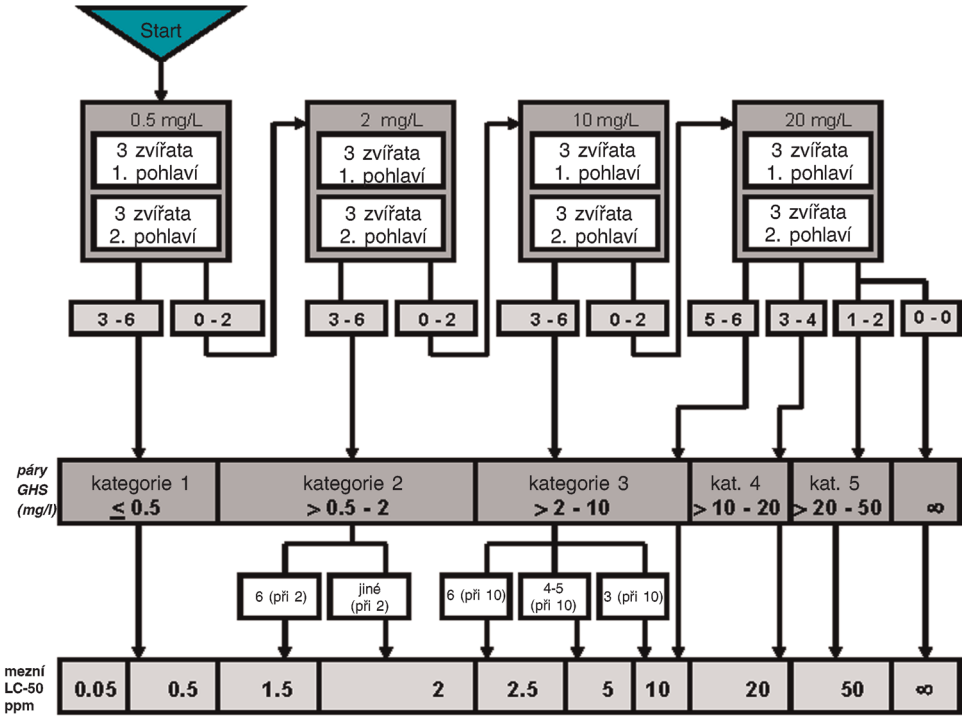
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼M4

Dodatek 3a

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 0,5 mg/l/4h



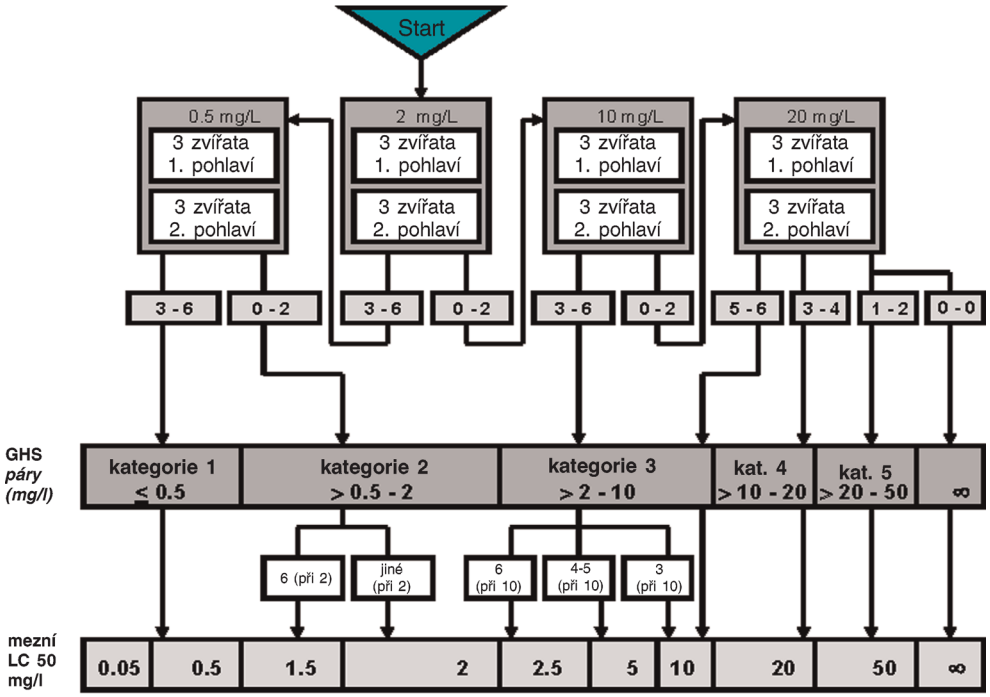
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci
— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 2 mg/l/4h



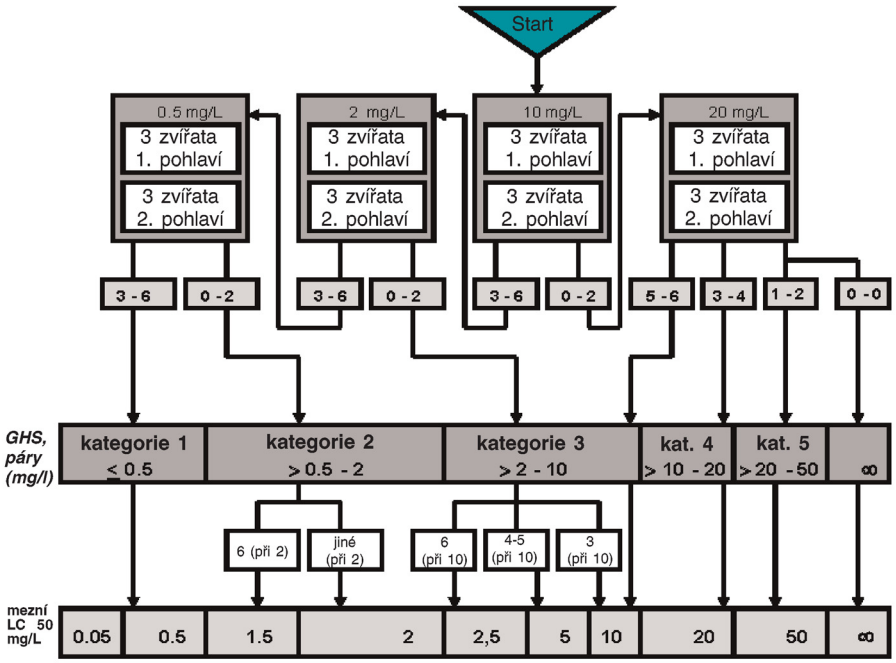
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci
— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 10 mg/L/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

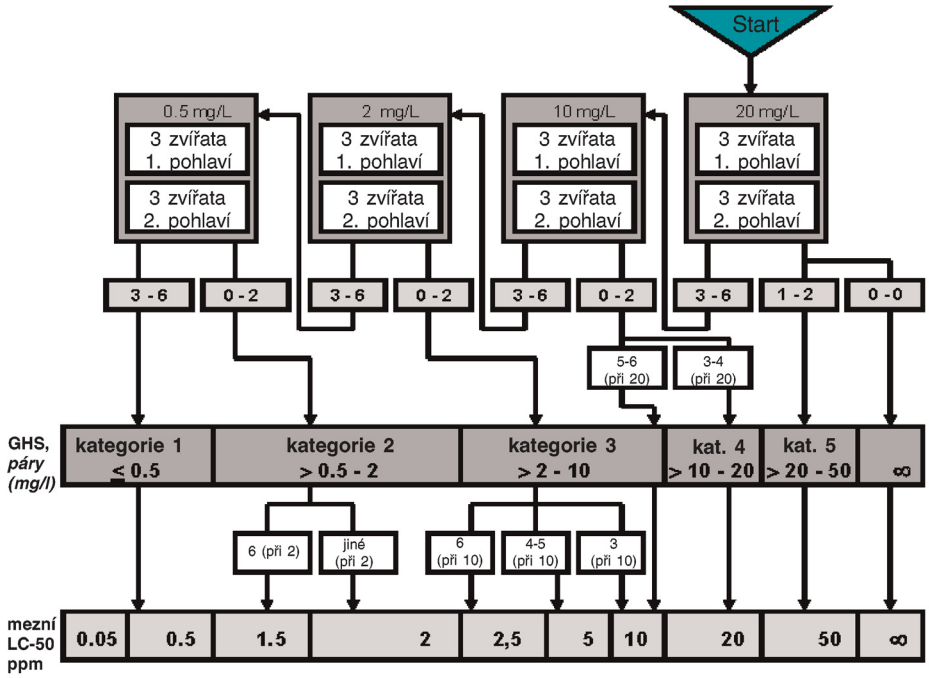
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušebnní postup s výchozí koncentrací par 20 mg/l/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u aerosolů (mg/1/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 4a: Výchozí koncentrace je 0,05 mg/l

Dodatek 4b: Výchozí koncentrace je 0,5 mg/l

Dodatek 4c: Výchozí koncentrace je 1 mg/l

Dodatek 4d: Výchozí koncentrace je 5 mg/l

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

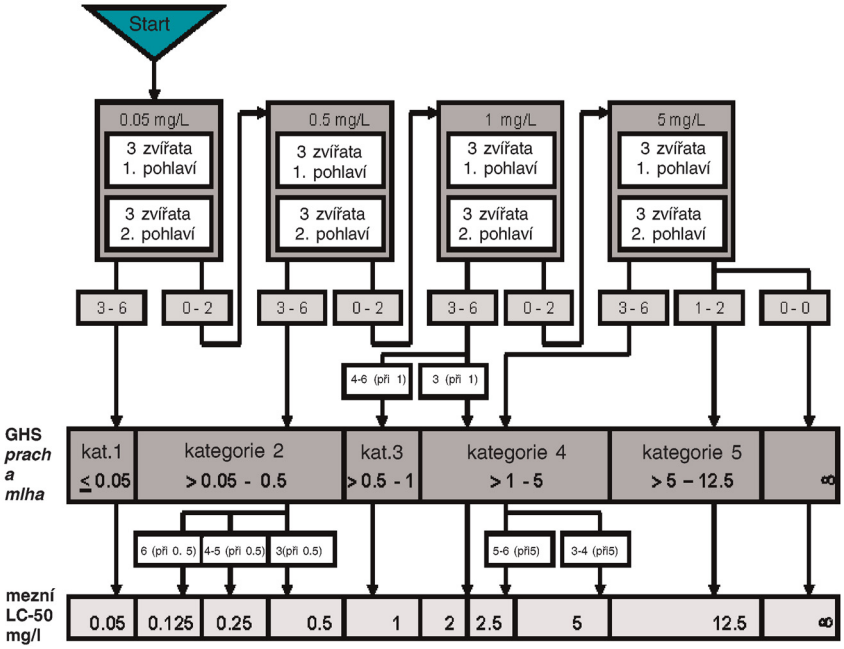
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼M4

Dodatek 4a

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 0,05 mg/L/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

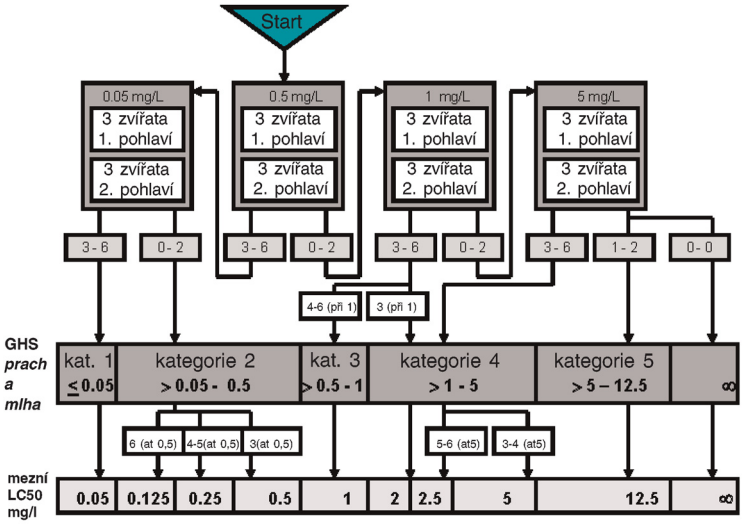
— zkoušeno při 12,5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí konkcentrací aerosolů 0,5 mg/l/4h



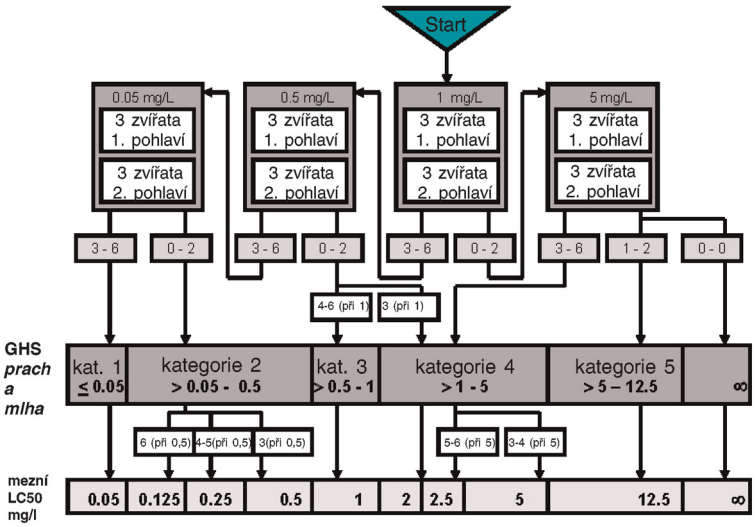
— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí konkcentrací aerosolů 1 mg/l/4h



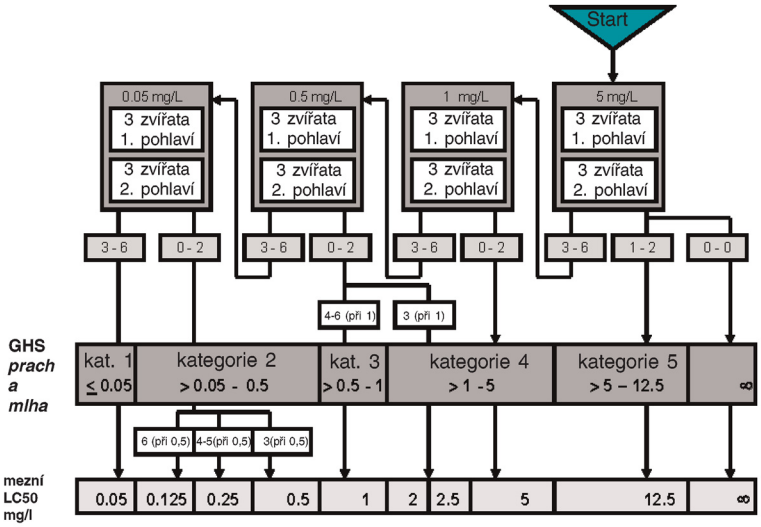
— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací aerosolů 5 mg/l/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krom
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)“

▼M5

B.53. STUDIE VÝVOJOVÉ NEUROTOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 426 (2007). Pracovní skupina OECD pro reprodukční a vývojovou toxicitu na svém zasedání v červnu 1995 v Kodani jednala o potřebě aktualizovat stávající pokyny OECD pro zkoušení reprodukční a vývojové toxicity a vypracovat nové pokyny pro účinky, pro které pokyny ještě neexistují (1). Pracovní skupina doporučila, aby pokyn pro zkoušení vývojové neurotoxicity byl vypracován na základě pokynu Úřadu pro ochranu životního prostředí USA (US EPA), který byl později revidován (2). V červnu 1996 se v Kodani konala druhá konzultační schůzka, která poskytla sekretariátu doporučení k nástinu nového pokynu pro zkoušení vývojové neurotoxicity, včetně jejich hlavních prvků, např. podrobností týkajících se volby druhu zvířat, období podávání dávek, doby zkoušky, výsledných parametrů, které mají být posuzovány, a kritérií pro hodnocení výsledků. V roce 1998 byl zveřejněn pokyn USA pro posuzování rizik neurotoxicity (3). V říjnu 2000 se konala konzultační schůzka odborníků OECD, na kterou bezprostředně navázal seminář vědeckého ústavu pro výzkum rizik ILSI, a v roce 2005 se uskutečnila konzultační schůzka odborníků v Tokiu. Cílem těchto zasedání bylo projednat vědecké a technické otázky související se stávajícím pokynem pro zkoušení a doporučení, jež z těchto zasedání vzešla (4)(5)(6)(7), byla zvážena při vývoji této zkušební metody. Další informace týkající se provádění, interpretace a použité terminologie této zkušební metody lze najít v Pokynu OECD č. 43 „Zkoušení a posuzování reprodukční toxicity“ (8) a Pokynu OECD č. 20 „Zkoušení neurotoxicity“ (9).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. Je známo, že některé chemické látky mají vývojové neurotoxické účinky na člověka a další druhy (10)(11)(12)(13). Aby bylo možno posoudit a zhodnotit toxické vlastnosti určité chemické látky, může být nutné stanovit, jaká je její schopnost vývojové neurotoxicity. Studie vývojové neurotoxicity jsou koncipovány s cílem poskytnout údaje, včetně charakterizace vztahu dávka-odpověď, o možných funkčních a morfologických účincích na vývoj nervové soustavy potomstva, jež mohou vzniknout v důsledku expozice *in utero* a v časném postnatálním období života.

3. Studii vývojové neurotoxicity lze provádět jako samostatnou studii, začlenit ji do studie reprodukční toxicity a/nebo neurotoxicity dospělých zvířat (např. zkušební metody B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) nebo ji připojit ke studii prenatální vývojové toxicity (např. zkušební metoda B.31 (17)). Je-li studie vývojové neurotoxicity začleněna do jiné studie nebo připojena k jiné studii, musí být bezpodmínečně zachována integrita obou typů studií. Všechny zkoušky musí splňovat platné právní předpisy nebo státní a institucionální pokyny pro používání laboratorních zvířat ve výzkumu (např. (18)).

4. Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce. Součástí těchto informací je totožnost a struktura chemické látky, její fyzické a chemické vlastnosti, výsledky jiných zkoušek toxicity dané chemické látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách a očekávané použití chemické látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

▼M5

PODSTATA ZKOUŠKY

5. Zkoušená chemická látka se podává zvířatům v době březosti a laktace. Jsou testovány matky za účelem posouzení účinků na březí a kojící samice a zkouška může také poskytnout informace pro srovnání (mezi matkou a potomstvem). Z vrhů se náhodně vybere potomstvo pro hodnocení neurotoxicity. Hodnocení se skládá z pozorování za účelem zjištění závažných neurologických abnormalit a abnormalit v chování, včetně posouzení fyzického vývoje, behaviorální ontogeneze, motorické aktivity, motorických a smyslových funkcí a učení a paměti; a hodnocení hmotností mozku a neuropatologie během postnatálního vývoje a v dospělosti.

6. Pokud se zkušební metoda provádí jako samostatná studie, lze další dostupná zvířata z každé skupiny použít pro specifická neurobehaviorální, neuropatologická, neurochemická nebo elektrofyziologická vyšetření, která mohou doplnit údaje získané z vyšetření doporučených touto zkušební metodou (16)(19)(20)(21). Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, pokud empirické pozorování, očekávané účinky nebo mechanismus účinku ukazují na specifický typ neurotoxicity. Tyto doplňující postupy lze použít na matkách i na mláďatech. Kromě toho lze použít také postupů *ex vivo* nebo *in vitro*, pokud tyto zkoušky nezmění integritu postupů *in vivo*.

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU

Výběr druhu zvířat

7. Upřednostňovaným zkušebním druhem je potkan; případně lze použít i jiné druhy. Je však třeba mít na paměti, že období březosti a období postnatálního vývoje stanovené v této zkušební metodě jsou specifické pro běžně užívané kmeny potkanů, a pokud jsou použity jiné druhy nebo neobvyklé kmeny, měla by být zvolena srovnatelná období. Použití jiných druhů by mělo být zdůvodněno na základě toxikologických, farmakokinetických a/nebo jiných údajů. Zdůvodnění by mělo obsahovat dostupné postnatální neurobehaviorální a neuropatologické hodnocení specifické pro daný druh. Jestliže existuje dřívější zkouška, která vyvolala pozornost, mělo by být zváženo, na kterém druhu/kmenu byla provedena. Vzhledem k různým reakcím jednotlivých kmenů potkanů by měly existovat důkazy o tom, že kmen zvolený k použití má přiměřenou plodnost a citlivost. Spolehlivost a citlivost jiných druhů pro účely zjišťování vývojové neurotoxicity by měly být zdokumentovány.

Podmínky chovu a krmení

8. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místností; avšak cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Před pářením a po dobu trvání studie lze rovněž světelný cyklus obrátit, aby bylo možné posoudit sledované funkční a behaviorální vlastnosti za tmy (pod červeným světlem), tj. v době, kdy jsou zvířata za běžných podmínek aktivní (22). Veškeré změny v rytmu světla a tmy by měly zahrnovat přiměřenou dobu na aklimatizaci, aby se zvířatům umožnilo přizpůsobit se novému rytmu. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Druhy krmiva a vody by měly být zaznamenány a měly by být analyzovány na přítomnost kontaminujících látek.

▼M5

9. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo je umístit do klecí v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po spáření nebo nejpozději v 15. den březosti by oplodněné samice měly být umístěny individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. S blížící se dobou vrhu by oplodněným samicím měl být poskytnut odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres v době březosti může vést k nepříznivým následkům, včetně prenatální ztráty a změněného vývoje plodu a postnatálního vývoje. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nesouvisí s expozicí, by se mělo se zvířaty během březosti zacházet opatrně a zamezit stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. nadměrný vnější hluk.

Příprava zvířat

10. Použijí se zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům, pokud není studie začleněna do jiné studie (viz odstavec 3). Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Každému zvířeti by mělo být přiděleno jedinečné identifikační číslo a zvíře by jím mělo být označeno. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk a měla by být v rámci normálního rozpětí zkoumaného druhu a kmene. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které musí být nulipary. Je třeba dbát na to, aby nedocházelo k páření sourozenců. Nultým dnem gestace je den, kdy je zpozorována vaginální zátka a/nebo sperma. Jsou-li od dodavatele nakupována stejně dlouho březí zvířata, měla by jim být poskytnuta přiměřená doba (např. 2–3 dny) na aklimatizaci. Oplodněné samice se náhodným výběrem přidělí do kontrolních a experimentálních skupin a měly by být do skupin rozděleny pokud možno rovnoměrně (pro zajištění rovnoměrného rozdělení do všech skupin se doporučuje např. postup stratifikovaného náhodného výběru, jako je postup založený na tělesné hmotnosti). Samice oplodněné stejným samcem by měly být rovnoměrně rozděleny do všech skupin.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

11. V každé zkušební a kontrolní skupině by měl být dostatečný počet březích samic, které budou exponovány zkoušené chemické látce, aby se zajistilo, že se narodí dostatečný počet potomků pro hodnocení neurotoxicity. Pro každou úroveň dávky se doporučuje použít celkem 20 vrhů. Jsou povoleny režimy s opakovaným a stupňovitým podáváním, pokud je dosažen celkový počet vrhů v každé skupině a pokud jsou použity vhodné statistické metody zohledňující opakování.

12. Ve 4. postnatální den nebo dříve (postnatální den 0 je den vrhu) musí být velikost každého vrhu upravena odstraněním nadbytečných mláďat, aby byla dosažena stejná velikost všech vrhů (3). Velikost vrhu by neměla přesahovat průměrnou velikost vrhu u použitého kmene hlodavců (8–12 mláďat). Ve vrhu by měl být pokud možno stejný počet mladých samců a samic. Selektivní odstraňování mláďat, např. na základě tělesné hmotnosti, není vhodné. Po standardizaci velikosti vrhů (utracení) a před dalším zkoušením sledovaných funkčních ukazatelů by jednotlivá mláďata, která jsou určena pro zkoušky před odstavením a po odstavení, měla být jednoznačně identifikována pomocí jakékoli vhodné humánní metody pro identifikaci mláďat (např. (24)).

▼M5

Přiřazení zvířat pro funkční a behaviorální zkoušky, hmotnost mozků a neuropatologická hodnocení

13. Tato zkušební metoda umožňuje různé způsoby přiřazení zvířat exponovaných *in utero* a prostřednictvím laktace pro funkční a behaviorální zkoušky, určení pohlavní zralosti, stanovení váhy mozku a neuropatologické hodnocení (25). V jednotlivých případech lze přidat i jiné zkoušky neurobehaviorálních funkcí (např. sociálního chování), neurochemie nebo neuropatologie, pokud nebude ohrožena integrita původně požadovaných zkoušek.

14. Z každé exponované skupiny se ve 4. postnatální den nebo později vyberou mláďata a přiřadí se pro posouzení sledovaných vlastností. Výběr mláďat by měl být prováděn tak, aby při všech zkouškách byla v každé exponované skupině v největším možném rozsahu rovnoměrně zastoupena obě pohlaví z každého vrhu. Pro zkoušky motorické aktivity by měla být použita stejná dvojice mláďat samec-samice v každém zkoumaném věku před odstavením (viz odstavec 35). Pro všechny ostatní zkoušky lze pro různé behaviorální zkoušky použít tytéž páry mláďat nebo páry různé pro každou zkoušku. Pro zkoušky poznávacích funkcí odstavených mláďat v porovnání s dospělými zvířaty bude možná nutné přiřadit odlišná mláďata, aby se zamezilo zkreslujícím účinkům věku a předchozího návyku na tato měření (26)(27). Při odstavení (21. postnatální den) lze mláďata, která nebyla vybrána ke zkouškám, humánně usmrtit. Veškeré změny v přiřazení mláďat musí být zaznamenány. Statistickou jednotkou pro vyhodnocování výsledků by měl být vrh (nebo samice), a nikoli mládě.

15. Existují různé způsoby přiřazování mláďat k vyšetřením před odstavením a po odstavení, zkouškám poznávacích schopností, patologickým vyšetřením atd. (o obecném konceptu viz obrázek 1 a příklady přiřazení viz dodatek 1). Doporučené minimální počty zvířat v každé exponované skupině pro vyšetření před odstavením a po odstavení jsou tyto:

Klinická pozorování a tělesná hmotnost	Všechna zvířata
Podrobná klinická pozorování	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Hmotnost mozku (po fixaci) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Hmotnost mozku (nefixovaného) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace ponořením do fixačního roztoku nebo perfuzí) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace perfuzí) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Pohlavní zralost	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Jiné vývojové znaky (není povinné)	Všechna zvířata
Behaviorální ontogeneze	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorická aktivita	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorické a smyslové funkce	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Učení a paměť	10 od každého pohlaví [a] (1 z každého vrhu)

[a] V závislosti na citlivosti zkoušek poznávacích funkcí by mělo být zváženo vyšetření mnohem většího počtu zvířat, např. až 1 samce a 1 samice z každého vrhu (o přiřazení zvířat viz dodatek 1) (další pokyny týkající se velikosti vzorku obsahuje Pokyn OECD č. 43 (8)).

▼M5

Dávkování

16. Použijí se alespoň tři dávky a souběžná kontrolní skupina. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení vyplývající z fyzikálně-chemické podstaty nebo biologických vlastností chemické látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou toxicitu u březí samice (např. klinické znaky, snížení přírůstku tělesné hmotnosti (ne více než o 10 %) a/nebo projevy limitní toxické dávky pro cílový orgán). Nejvyšší dávku lze s určitými výjimkami omezit na 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den. Avšak například velikost očekávané expozice člověka může vyvolat potřebu použití vyšší dávky. Jinak by měly být provedeny předběžné studie nebo předběžné orientační zkoušky s cílem určit, jaké nejvyšší dávkování má být použito, aby způsobilo minimální stupeň toxicity pro matku. Pokud se ve standardní studii vývojové toxicity nebo v předběžné studii ukázalo, že zkoušená chemická látka je vývojově toxická, měla by nejvyšší úrovní dávky být maximální dávka, která nevyvolá nadměrnou toxicitu pro potomstvo, nebo toxicitu *in utero* nebo neonatální toxicitu, popřípadě malformace v míře znemožňující provést smysluplné hodnocení neurotoxicity. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity pro matku ani žádné známky vývojové toxicity, včetně neurotoxicity. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL) nebo by měly být použity dávky blížící se mezi detekovatelnosti, které by umožnily stanovení referenční dávky. Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou exponovanou skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 10) mezi dávkami.

17. Při výběru dávek je třeba brát v úvahu veškeré existující údaje o toxicitě a také další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené chemické látky nebo látek příbuzných. Tyto informace mohou rovněž pomoci při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu. Přímé podávání mláďatům by mělo být zváženo na základě informací o expozici a farmakokinetických informací (28)(29). Před prováděním studií s přímým dávkováním by měly být pečlivě zváženy přínosy a nevýhody (30).

18. Souběžnou kontrolní skupinou by měla být kontrolní skupina s napodobeným podáváním nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené chemické látky používá. Normálně by měl být všem zvířatům podáván stejný objem zkoušené chemické látky nebo vehikula na základě tělesné hmotnosti. Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující možnosti: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou ovlivnit její toxický účinek, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo na nutriční stav zvířat. Vehikulum by nemělo vyvolávat účinky, které by mohly ovlivnit interpretaci studie, nemělo by být neurobehaviorálně toxické a nemělo by mít vliv na rozmnožování nebo vývoj. V případě nových vehikul by kromě kontrolní skupiny s vehikulem měla být zařazena také kontrolní skupina s napodobeným podáváním. Se zvířaty v kontrolní skupině (skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině.

▼M5

Podávání dávek

19. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány cestami nejvhodnějšími z hlediska potenciální expozice člověka a na základě dostupných informací o metabolismu a distribuci u zkušebních zvířat. Podávány budou zpravidla orální cestou (např. sondou nebo v potravě či v pitné vodě), ale lze použít i jiné cesty (např. dermální expozici, inhalaci) v závislosti na vlastnostech a očekávaných nebo známých způsobech expozice člověka (další pokyny jsou uvedeny v Pokynu OECD č. 43 (8)). Zvolený způsob podávání je třeba zdůvodnit. Zkoušená chemická látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

20. Obvykle by dávka podávaná jednotlivým zvířatům měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti. Pokud je u experimentálních samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí.

21. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány oplodněným samicím nejméně jednou denně od doby implantace (6. den gestace) po celé období laktace (21. postnatální den), takže mláďata jsou zkoušené chemické látce exponována během prenatálního i postnatálního neurologického vývoje. Věk, ve kterém se začne dávka podávat, a trvání a frekvenci podávání dávky lze upravit, pokud existují poznatky, že jiné experimentální uspořádání je vhodnější z hlediska expozice člověka. Pro jiné druhy je podávání dávek nutno přizpůsobit tak, aby se zajistila expozice během všech raných období vývoje mozku (tj. odpovídajících prenatálnímu a raně postnatálnímu růstu lidského mozku). Podávání dávek může začít od vyvolání březosti (nultý den gestace), avšak měla by být zvážena schopnost zkoušené chemické látky způsobit preimplantační ztráty. Podávání od 6. dne gestace by toto riziko vyloučilo, ale nebyla by podchycena stadia vývoje mezi nultým a 6. dnem gestace. Jestliže laboratoř nakupuje zvířata spářená ve stejnou dobu, začínat podávání dávky v nultý den gestace je nepraktické, a vhodným počátečním dnem by proto byl 6. den gestace. Zkušební laboratoř by měla stanovit režim dávkování na základě příslušných informací o účincích zkoušené chemické látky, předchozích zkušeností a s ohledem na logistické zajištění; to může zahrnovat prodloužení podávání dávek po odstavení. Dávky by neměly být podávány v den vrhu těm zvířatům, která nevrhla celé své potomstvo. Obecně se předpokládá, že k expozici mláďat dojde prostřednictvím mateřského mléka; v případech, kdy není dostatek důkazů o kontinuální expozici potomstva, by však mělo být zváženo přímé dávkování potomstvu. Důkazy o kontinuální expozici lze čerpat např. z farmakokinetických informací, toxicity potomstva nebo změn v biologických markerech (28).

POZOROVÁNÍ

Pozorování samic

22. U všech samic se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav, včetně nemocnosti a úmrtnosti.

23. V období aplikace a pozorování by mělo být periodicky (nejméně dvakrát za období podávání látky za březosti a dvakrát za období podávání látky v době laktace) prováděno podrobnější klinické pozorování nejméně deseti samic na každé úrovni dávky. Zvířata by měla být pozorována mimo chovnou klec kvalifikovanými laboranty, kteří nejsou informováni o tom, do jaké experimentální skupiny zvíře patří, a s použitím standardizovaných postupů, které mají minimalizovat stres u zvířat a neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování v rámci dané studie prováděl pokud možno stejný laborant.

▼M5

24. Přítomnost zpozorovaných příznaků se zaznamená. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost zpozorovaných příznaků. Klinická pozorování by se měla mimo jiné zaměřit na změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a autonomní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace).

25. Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí, třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

26. Zaznamenají se příznaky toxicity, včetně dne jejich nástupu, denní doby, stupně a trvání.

27. Zvířata by se měla v době podávání dávek vážit nejméně jednou týdně po celou dobu studie, v den vrhu nebo jeho blízkosti a v 21. postnatální den (odstavení). Ve studiích podávání látky žaludeční sondou by měly být samice váženy nejméně dvakrát týdně. Při každém stanovení tělesné hmotnosti by měly být upraveny dávky podle potřeby. Během gestačního a laktačního období se spotřeba potravy měří minimálně každý týden. Pokud je expozice prováděna pomocí pitné vody, měří se spotřeba vody nejméně jednou týdně.

Pozorování potomstva

28. Veškeré potomstvo se nejméně jednou denně bedlivě pozoruje, aby se zjistily příznaky toxicity, nemocnost a úmrtnost.

29. Během doby aplikace a pozorování by mělo být prováděno podrobnější klinické pozorování potomstva. Pozorování potomstva (nejméně jedno mládě od každého pohlaví a vrhu) by měli provádět kvalifikovaní laboranti, kteří nejsou informováni o tom, do které experimentální skupiny zvířata patří, a s použitím standardizovaných postupů s cílem minimalizovat neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování prováděl pokud možno stejný laborant. Sledují se přinejmenším sledované vlastnosti popsané v odstavci 24 a 25 podle potřeby vývojového stadia, které je pozorováno.

30. Zaznamenají se veškeré příznaky toxicity u potomstva, včetně dne nástupu, denní doby, stupně a trvání.

Fyzické a vývojové znaky

31. Změny ve vývojových znacích v období před odstavením (např. otevření uší a očí, prořezávání řezáků) úzce souvisejí s tělesnou hmotností (30)(31). Tělesná hmotnost může být nejlepším ukazatelem fyzického vývoje. Měření vývojových znaků se proto doporučuje provádět pouze tehdy, jestliže existují dřívější poznatky, že tyto sledované vlastnosti poskytnou doplňující informace. Časový rozvrh pro posuzování těchto parametrů je uveden v tabulce 1. Lze doporučit, aby v závislosti na očekávaných účincích a na výsledcích počátečních měření byly doplněny další časové body nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.

▼M5

32. Při posuzování fyzického vývoje se doporučuje použít postkoitální věk, a nikoli postnatální věk (33). Jsou-li mláďata testována v den odstavení, doporučuje se, aby byly tyto zkoušky prováděny před skutečným odstavením, aby se vyloučil zkreslující účinek stresu spojeného s odstavením. V období po odstavení by kromě toho neměly být prováděny žádné zkoušky během dvou dnů po odstavení.

Tabulka 1

Časový rozvrh posuzování fyzických a vývojových znaků a sledovaných funkčních/behaviorálních vlastností [a]

Období věku / Sledované vlastnosti	Před odstavením [b]	Dospívání [b]	Mladá dospělost [b]
Fyzické a vývojové znaky			
Tělesná hmotnost a klinická pozorování	týdně [c]	nejméně jednou za dva týdny	nejméně jednou za dva týdny
Hmotnost mozku	22. postnatální den [d]		při ukončení studie
Neuropatologie	22. postnatální den [d]		při ukončení studie
Pohlavní zralost	—	podle vhodnosti	—
Další vývojové znaky [e]	podle vhodnosti	—	—
Sledované funkční/behaviorální vlastnosti			
Behaviorální ontogeneze	nejméně dvě měření		
Motorická aktivita (včetně přivykání)	1–3krát [f]	—	jednou
Motorické a smyslové funkce	—	jednou	jednou
Učení a paměť	—	jednou	jednou

[a] Tato tabulka uvádí minimální počet měření, jež by měla být prováděna. Lze doporučit, aby na základě očekávaných účinků a výsledků počátečních měření byly doplněny další časové body (např. starší zvířata) nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.

[b] Doporučuje se, aby mláďata nebyla testována v prvních dvou dnech po odstavení (viz odstavec 32). Doporučený věk pro testování dospívajících je: učení a paměť = 25. postnatální den ± 2; motorické a smyslové funkce = 25. postnatální den ± 2. Doporučený věk pro testování mladých dospělých je 60.–70. postnatální den.

[c] Tělesná hmotnost by měla být měřena nejméně dvakrát týdně při přímém dávkování mláďatům za účelem upravení dávek v době rychlého nárůstu tělesné hmotnosti.

[d] Hmotnost mozku a neuropatologii lze případně posuzovat poněkud dříve (např. 11. postnatální den) (viz odstavec 39).

[e] Případně by kromě tělesné hmotnosti měly být zaznamenány i jiné vývojové znaky (např. otevření očí) (viz odstavec 31).

[f] Viz odstavec 35.

33. Živá mláďata se spočítají a rozdělí podle pohlaví, např. vizuální prohlídkou nebo měřením vzdálenosti od konečníku ke genitálu (34)(35) a každé mládě ve vrhu se jednotlivě zváží při narození nebo krátce po něm, nejméně jednou týdně během laktace a poté nejméně jednou za dva týdny. Při hodnocení pohlavní zralosti by mělo být stanoveno stáří a tělesná hmotnost zvířete při vaginálním otevření (36) nebo odpojení předkožky (37) nejméně u jednoho samce a jedné samice z každého vrhu.

▼M5

Behaviorální ontogeneze

34. Ontogeneze vybraných chování by měla být měřena ve vhodném věku nejméně u jednoho mláděte od každého pohlaví a vrhu, přičemž ve všech zkušebních dnech by se pro všechna posuzovaná chování měla použít stejná mláďata. Dny měření by v tomto období měly být rozvrženy stejnoměrně, aby bylo možno stanovit běžnou změnu v ontogenezi uvedeného chování nebo změnu v souvislosti s aplikací (38). Dále jsou uvedeny některé příklady chování, u kterých by mohla být posuzována ontogeneze: reflex rovnováhy, negativní geotaxe a motorická aktivita (38)(39)(40).

Motorická aktivita

35. Motorická aktivita by měla být sledována (41)(42)(43)(44)(45) v období před odstavením a v dospělosti. Ke zkoušení v době odstavení viz odstavec 32. Zkušební sezení by mělo být dostatečně dlouhé, aby bylo možno prokázat přivykání neexponovaných kontrolních skupin v průběhu sezení. Behaviorální ontogenezi se důrazně doporučuje posuzovat pomocí motorické aktivity. Je-li prováděna zkouška behaviorální ontogeneze, měla by být při všech sezeních v období před odstavením použita stejná zvířata. Zkoušky by měly být prováděny dostatečně často, aby bylo možno posoudit ontogenezi přivykání v průběhu sezení (44). To může vyžadovat tři nebo více časových období před odstavením včetně dne odstavení (např. 13., 17. a 21. postnatální den). Testování stejných zvířat nebo sourozenců z vrhu by mělo být prováděno také v dospělosti nedlouho před ukončením studie (např. 60.–70. postnatální den). Podle potřeby lze provádět zkoušky i v dalších dnech. Motorická aktivita by měla být sledována přístrojem s automatizovaným zaznamenáváním aktivity, který by měl být schopen zjistit zvýšení i poklesy aktivity (tj. výchozí aktivita naměřená tímto zařízením by neměla být tak nízká, aby bránila zjištění zvýšení, ani tak vysoká, aby bránila zjištění poklesu aktivity. Každý přístroj by měl být odzkoušen standardními postupy, aby se zajistila co největší spolehlivost měření všemi přístroji a v různých dnech. Experimentální skupiny by měly být mezi přístroje rozděleny pokud možno vyváženě. Každé zvíře se testuje jednotlivě. Experimentální skupiny by měly být testovány vyváženě v různou denní dobu s cílem vyloučit zkreslení denními rytmy aktivity. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší a nesouvisely automaticky s aplikací. Mnohá měření chování včetně měření motorické aktivity mohou ovlivnit takové proměnné, jako je úroveň zvuku, velikost a tvar zkušební klece, teplota, relativní vlhkost, světelné podmínky, zápachy, použití chovné klece nebo nové, zkušební klece a odchylky v prostředí.

Motorické a smyslové funkce

36. Motorické a smyslové funkce se podrobně vyšetřují nejméně jednou za období dospívání a jednou v období mladé dospělosti (např. 60.–70. postnatální den). O testování v době odstavení pojednává odstavec 32. Zkoušení by se mělo provádět v dostatečném rozsahu, aby zajistilo dostatečný kvantitativní odběr vzorků smyslových podnětů (např. somatosenzorických, vestibulárních) a motorických aktivit (např. síla, koordinace). Jako několik příkladů zkoušek motorických a smyslových funkcí lze uvést vzpěrnou reakci extenzorů (46), reflex rovnováhy (47)(48), přivykání úlekové reakci na zvukový podnět (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) a evokované potenciály (55).

▼M5

Zkoušky učení a paměti

37. Zkouška asociativního učení a paměti se provádí po odstavení (např. 25. postnatální den ± 2 dny) a u mladých dospělých (60. postnatální den a starší). K testování v době odstavení viz odstavec 32. V obou těchto vývojových stadiích lze použít stejnou nebo odlišnou zkoušku (zkoušky). Při volbě zkoušky (zkoušek) učení a paměti u odstavených mláďat a dospělých potkanů je povolena určitá pružnost. Zkoušky by však měly být koncipovány tak, aby splňovaly dvě kritéria. Zaprvé, učení by mělo být posuzováno buď jako změna mezi několika opakovanými pokusy nebo sezeními zabývajícími se učením, nebo při zkouškách sestávajících z jediného pokusu s odkazem na určitou podmínku, která kontroluje neasociativní účinky zkušeností získaných výcvikem. Zadruhé, zkoušky by kromě počátečního učení (nabytí) měly zahrnovat určité měření paměti (krátkodobé nebo dlouhodobé), ale toto měření paměti nelze zaznamenat bez měření osvojených prvků získaných při stejné zkoušce. Jestliže zkouška (zkoušky) učení a paměti zjistí účinek zkoušené chemické látky, lze zvážit další zkoušky za účelem vyloučení jiné interpretace založené na změnách smyslových, motivačních a/nebo motorických schopností. Kromě obou výše uvedených kritérií se doporučuje, aby byla zkouška učení a paměti zvolena na základě prokázané citlivosti na třídu zkoumaných chemických látek, pokud jsou takové informace v literatuře dostupné. Pokud takové informace neexistují, lze pro splnění výše uvedených kritérií provést například tyto zkoušky: pasivní vyhýbání (43)(56)(57), test pracovní paměti (DMP) pro dospělé potkany (58) a mláďata potkanů (59), čichové podmiňování (43)(60), Morrisovo vodní bludiště (61)(62)(63), Bielovo bludiště nebo bludiště Cincinnati (64)(65), radiální bludiště (66), „T“ bludiště (43) a osvojení a uchovávání pravidelných návyků (26)(67)(68). V literatuře jsou popsány další zkoušky pro odstavená mláďata (26)(27) a dospělé potkany (19) (20).

Pitva

38. Matky lze po odstavení potomstva utratit.

39. Neuropatologické hodnocení potomstva se provede vyšetřením tkání zvířat humánně usmrcených v 22. postnatální den nebo v dřívějším časovém bodě mezi 11. a 22. postnatálním dnem, jakož i při ukončení studie. U potomstva usmrceného do 22. postnatálního dne se hodnotí mozkové tkáně, u zvířat usmrcených při ukončení se hodnotí tkáně centrální nervové soustavy (CNS) a tkáně periferní nervové soustavy (PNS). Zvířata usmrcená v 22. postnatální den nebo dříve lze fixovat ponořením do fixačního roztoku nebo perfuzí. Zvířata usmrcená při ukončení studie by měla být fixována perfuzí. Všechny aspekty přípravy tkáňových vzorků, od perfuze zvířat, přes odebrání tkáňových vzorků, zpracování tkání a barvení preparátů by měly být vyváženě koncipovány tak, aby každá sada obsahovala reprezentativní vzorky z každé exponované skupiny. Další pokyny týkající se neuropatologie lze nalézt v Pokynu OECD č. 20 (9), viz také (103).

Zpracování tkáňových vzorků

40. Všechny závažné abnormality zjevné v průběhu pitvy se zaznamenají. Odebrané tkáňové vzorky by měly reprezentovat všechny hlavní oblasti nervové soustavy. Vzorky tkání by měly být ponechány ve vhodném fixativu a zpracovány podle standardizovaných zveřejněných histologických protokolů (69)(70)(71)(103). U tkání centrální nervové soustavy a periferní nervové soustavy je přípustné zalití do parafinu, avšak je-li požadován větší stupeň rozlišení (např. u periferních nervů, pokud existuje

▼M5

podezření na periferální neuropatii a/nebo při morfometrické analýze periferních nervů), může být vhodná postfixace osmiem spolu se zalitím do pryskyřice. Mozkové tkáně získané pro morfometrickou analýzu by měly být zality do vhodného média na všech úrovních dávky ve stejnou dobu, aby se zamezilo artefaktům vzniklým smrštěním, ke kterému může dojít v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

Neuropatologické vyšetření

41. Účelem kvalitativního vyšetření je:

i) zjistit oblasti nervové soustavy vykazující známky neuropatologických změn;

ii) zjistit typy neuropatologických změn vyplývajících z expozice zkoušené chemické látce; a

iii) stanovit míru závažnosti těchto neuropatologických změn.

Reprezentativní histologické řezy tkáňových vzorků se mikroskopicky zkoumají za účelem prokázání neuropatologických změn, vyšetření provádí patolog s odpovídající kvalifikací. Všem neuropatologickým změnám se přiřadí subjektivní stupeň vyjadřující jejich závažnost. Pro hodnocení řezů mozku zvířat, jež byla humánně usmrcena v 22. postnatální den nebo dříve, může být dostatečné barvení pomocí hematoxylinu a eosinu. U řezů tkání centrální nervové soustavy a periferní nervové soustavy zvířat usmrcených při ukončení studie se však doporučuje použít barviva na myelin (např. luxolová modř/kresylová violeť) a barvení stříbrem (např. podle Bielschowského nebo Bodiana). Na základě odborného úsudku patologa a druhu pozorovaných změn lze zvážit jiná barvení vhodná pro zjištění a charakterizaci konkrétních typů změn (např. gliální fibrilární acidický protein (GFAP) nebo lektinová histochemie pro posouzení gliálních a mikrogliálních změn (72), fluoro-jade pro zjišťování nekrózy (73)(74) nebo stříbrná barvení používaná při degeneraci nervové soustavy (75)).

42. Mělo by být prováděno morfometrické (kvantitativní) hodnocení, jelikož tyto údaje mohou pomoci při zjišťování účinků souvisejících s expozicí a jsou cenné pro interpretaci rozdílů v hmotnosti mozku nebo v morfologii souvisejících s expozicí. K tomu, aby bylo možno provést morfometrické hodnocení, je třeba odebrat a připravit nervovou tkáň. Morfometrická hodnocení mohou zahrnovat např. lineární nebo plošné měření konkrétních oblastí mozku (78). Lineární nebo plošná měření vyžadují použití homologických řezů pečlivě vybraných na základě spolehlivých mikroskopických znaků (6). Ke zjištění účinků expozice na parametry, jako je objem konkrétních neuroanatomických oblastí nebo počet buněk v těchto oblastech lze použít stereologii (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Vyšetření mozků by se mělo zaměřit na veškeré příznaky neuropatologických změn souvisejících s expozicí a měly by být odebrány dostatečné vzorky ze všech hlavních oblastí mozku (např. čichové laloky, mozková kůra, hippocampus, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek (tektum, tegmentum a pedunculi cerebrales), Varolův most, prodloužená mícha, mozeček), což umožní důkladné vyšetření. Je důležité, aby řezy byly u všech zvířat prováděny ve stejné rovině. Z dospělých zvířat humánně usmrcených při ukončení studie se odeberou reprezentativní řezy páteřní míchy a periferní nervové soustavy. Zkoumané oblasti by měly zahrnovat oko s očním nervem a sítnicí, míchu v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorzální a ventrální kořenová vlákna, n. ischiadicus – proximální část a n. tibialis – proximální část (v oblasti kolena) a n. tibialis z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy.

▼M5

44. Neuropatologické hodnocení by mělo zahrnovat vyšetření na příznaky vývojových poškození nervové soustavy (6)(85)(86)(87)(88)(89), dále na buněčné změny (např. vakuolizace, degenerace a nekróza neuronů) a tkáňové změny (např. glióza, infiltrace leukocytů, tvorba cyst). V této souvislosti je důležité odlišit účinky související s expozicí od běžných vývojových jevů, ke kterým, jak známo, dochází ve stadiu vývoje odpovídajícím době usmrcení (90). Významnými změnami, jež ukazují na vývojovou poruchu, jsou mimo jiné tyto:

— změny v absolutní velikosti nebo tvaru čichových laloků, mozku nebo mozečku,

— změny v relativní velikosti různých oblastí mozku, včetně zvětšené nebo zmenšené velikosti oblastí vyplývající ze ztráty nebo přetrvávání normálně přechodných populací buněk nebo z axonálních projekcí (např. vnější zárodečná vrstva mozečku, kalózní těleso),

— změny v proliferaci, migraci a diferenciaci ověřené podle oblastí nadměrné apoptózy nebo nekrózy, klastrů nebo rozptýlených populací ektopických, dezorientovaných nebo malformovaných neuronů, nebo změny v relativní velikosti různých vrstev kortikálních struktur,

— změny v myelinaci, včetně snížení celkové velikosti nebo odlišného zbarvení myelinových struktur,

— příznaky hydrocefalu, zejména zvětšení komor, stenóza cerebrálního akvaduktu a zúžení cerebrálních hemisfér.

Analýza neuropatologických změn z hlediska vztahu dávka-odpověď

45. Pro kvalitativní a kvantitativní neuropatologické analýzy se doporučuje následující postup sestávající z postupných kroků. Zaprvé, řezy ze skupiny, které byla podávána vysoká dávka, se porovnají s řezy z kontrolní skupiny. Jestliže se u zvířat ze skupiny s vysokou dávkou nenajdou žádné příznaky neuropatologických změn, není žádná další analýza nutná. Jestliže se ve skupině s vysokou dávkou najdou příznaky neuropatologických změn, vyšetří se zvířata ze skupin, kterým byla podávána střední a nízká dávka. Jestliže je skupina s vysokou dávkou ukončena v důsledku úhynu nebo jiné zkreslující toxicity, měly by se analyzovat neuropatologické změny ve skupinách s vysokou a střední dávkou. Existují-li jakékoli příznaky neurotoxicity ve skupinách s nižší dávkou, měla by být provedena neuropatologická analýza těchto skupin. Jestliže se při kvalitativním nebo kvantitativním vyšetření naleznou neuropatologické změny související s expozicí, měla by být stanovena závislost výskytu, četnost a stupeň závažnosti lézí nebo morfometrických změn na velikosti dávky, a to na základě hodnocení všech zvířat ze všech exponovaných skupin. Do tohoto hodnocení by měly být zařazeny všechny oblasti mozku, které vykazují příznaky neuropatologické změny. U každého typu lézí by měly být popsány typické znaky, podle nichž byl stanoven každý stupeň závažnosti, a uvedou se prvky sloužící k odlišení každého stupně od ostatních stupňů. Zaznamená se četnost a stupeň závažnosti každého typu lézí a provede se statistická analýza za účelem zhodnocení vztahu dávka-odpověď. Doporučuje se použít kódované preparáty (91).

ÚDAJE A ZPRÁVy

Údaje

46. Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byly u každé experimentální skupiny uvedeny typy změn a počet samic, potomstvo podle pohlaví a vrhy vykazující každý typ změny. Pokud byla prováděna přímá postnatální expozice potomstva, uvede se způsob, trvání a doba expozice.

▼M5

Hodnocení a interpretace výsledků

47. Studie vývojové neurotoxicity bude obsahovat informace o účincích opakované expozice určité chemické látce během vývoje *in utero* a raně postnatálního vývoje. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na ukazatele všeobecné toxicity i na ukazatele vývojové neurotoxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi účinky na vývoj nervové soustavy vyskytujícími se za nepřítomnosti všeobecné toxicity u matek a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí samice. V důsledku složitých vzájemných souvislostí mezi koncepcí studie, statistickou analýzou a biologickým významem údajů, bude odpovídající interpretace údajů o vývojové neurotoxicitě zahrnovat odborný posudek (107)(109). Při interpretaci výsledků zkoušek by měl být uplatněn přístup založený na existujících průkazných faktech (20)(92)(93)(94). Uvede se charakteristika behaviorálních nebo morfologických nálezů, pokud jsou přítomny, a poznatky o vztahu dávka-reakce. Tato charakterizace by měla zahrnovat údaje ze všech studií, které mají význam pro hodnocení vývojové neurotoxicity, včetně epidemiologických studií nebo případových studií u lidí a studií na pokusných zvířatech (např. toxikokinetické údaje, informace o vztahu struktura-účinek, údaje z jiných studií toxicity). Patří sem i vztah mezi dávkami zkoušené chemické látky a přítomností či nepřítomností, četností a rozsahem jakýchkoli neurotoxických účinků na každé pohlaví (20)(95).

48. Hodnocení údajů by mělo zahrnovat rozbor výsledků z hlediska jejich biologického i statistického významu. Na statistickou analýzu je nutno pohlížet jako nástroj k řízení, a nikoli nástroj předurčující interpretaci údajů. Nedostatečná statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro učinění závěru o neexistenci účinku souvisejícího s expozicí, stejně tak jako statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro vyvození závěru o existenci účinku souvisejícího s expozicí. Aby se zamezilo případným falešně negativním výsledkům a přirozeným potížím při „prokazování negativního“, měly by být podrobeny rozboru dostupné pozitivní a historické kontrolní údaje, zejména pokud neexistují žádné účinky související s expozicí (102)(106). Pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků by měla být analyzována s ohledem na celkové statistické hodnocení údajů (96). Hodnocení by mělo zahrnovat vztah mezi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálními změnami, pokud takový vztah existuje.

49. Všechny výsledky by měly být analyzovány pomocí statistických modelů vhodných z hlediska koncepce daného experimentu (108). Volba parametrické nebo neparametrické analýzy by měla být zdůvodněna s přihlédnutím k takovým faktorům, jakými jsou povaha údajů (zda jsou transformovány, či nikoli) a jejich distribuce, jakož i relativní spolehlivost zvolené statistické analýzy. Záměr a koncepce studie by měly určovat volbu metod statistické analýzy, aby se minimalizovaly chyby typu I (falešně pozitivní) a typu II (falešně negativní) (96)(97)(104)(105). Vývojové studie, které používají druhy s vícečetnými vrhy, kdy je testováno více mláďat z každého vrhu, by měly mít ve statistickém modelu zahrnut i vrh, aby se zabránilo zvýšenému výskytu chyb I. typu (98)(99)(100)(101). Statistickou jednotkou pro hodnocení výsledků by měl být vrh, a nikoli mládě. Experimenty by měly být koncipovány tak, aby výsledky získané u sourozenců z vrhu nebyly považovány za nezávislá pozorování. Všechny sledované vlastnosti měřené opakovaně u stejného subjektu by měly být analyzovány pomocí statistických modelů, které zohledňují, že tato měření nejsou nezávislá.

Protokol o zkoušce

50. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje, včetně zdroje,

▼M5

— čistota přípravku a známé a/nebo předpokládané nečistoty.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění volby jiného vehikula, pokud není použita voda nebo fyziologický solný roztok.

Pokusná zvířata:

— použitý druh a kmen a zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit potkan,

— dodavatel pokusných zvířat,

— počet, věk na začátku a pohlaví zvířat;

— původ, podmínky chovu, strava, voda atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Podmínky pro provádění zkoušky:

— zdůvodnění volby dávek,

— zdůvodnění způsobu podání a doby podávání dávek,

— specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— metoda použitá pro jednoznačnou identifikaci samic a potomstva,

— podrobný popis postupu (postupů) náhodného výběru použitých pro přiřazení samic do experimentálních skupin, výběru mláďat pro utracení a zařazení mláďat do exponovaných skupin,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě nebo inhalaci (ppm) na skutečnou denní dávku (mg na 1 kg tělesné hmotnosti),

— podmínky prostředí,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (např. vodovodní, destilovaná),

— datum zahájení a datum ukončení studie.

Pozorování a zkušební postupy:

— podrobný popis postupů použitých pro standardizaci pozorování a postupů, jakož i operativních definic pro pozorování s bodovacím systémem hodnocení účinků,

— seznam všech použitých zkušebních postupů a zdůvodnění jejich použití,

— podrobnosti o použitých behaviorálních/funkčních, patologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,

— postupy pro kalibrování a zajištění rovnocennosti zařízení a vyvážení experimentálních skupin v rámci zkušebních postupů,

— stručné zdůvodnění všech rozhodnutí obsahujících profesionální úsudky.

▼M5

Výsledky (individuální i souhrnné, případně včetně střední hodnoty a rozptylu:

— počet zvířat na začátku studie a na konci studie,

— počet zvířat a vrhů použitých pro každou zkušební metodu,

— identifikační číslo každého zvířete a vrhu, z kterého pochází,

— velikost vrhu a střední hmotnost při narození podle pohlaví,

— údaje o tělesné hmotnosti a o změnách tělesné hmotnosti, včetně konečné tělesné hmotnosti samic a potomstva,

— údaje o spotřebě potravy a popřípadě o spotřebě vody (např. pokud je zkoušená látka podávána s pitnou vodou),

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity nebo úmrtnosti, popřípadě doba a příčina úmrtí,

— povaha, závažnost, trvání, den nástupu, denní doba a následný průběh podrobných klinických pozorování,

— bodové hodnocení každého vývojového znaku (hmotnost, pohlavní zralost a behaviorální ontogeneze) v každé době pozorování,

— podrobný popis všech behaviorálních, funkčních, neuropatologických, neurochemických, elektrofyziologických nálezů podle pohlaví, včetně nárůstů a poklesů v porovnání s kontrolními skupinami;

— pitevní nálezy,

— hmotnosti mozků,

— jakékoli diagnózy vyvozené z neurologických znaků a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo stavů,

— zobrazení exemplárních nálezů,

— zobrazení s nízkým rozlišením pro posouzení homologie řezů použitých pro morfometrii,

— údaje o absorpci a metabolismu, včetně doplňujících údajů ze samostatné toxikokinetické studie, je-li k dispozici,

— statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých pro analýzu údajů, a výsledky, bez ohledu na to, zda byly významné, či nikoli,

— seznam personálu studie, včetně jeho odborné kvalifikace.

Rozbor výsledků:

— informace o reakci na dávky podle pohlaví a skupin,

— význam veškerých dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky podle pohlaví a skupin,

— dopad toxikokinetických informací na závěry,

— podobnost účinků jakýmkoli známým látkám schopným vyvolat neurotoxicitu,

▼M5

— údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (tj. pozitivní a historické kontrolní údaje).

— souvislosti, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,

— NOAEL (hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku) nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a skupiny.

Závěry:

— rozbor celkové interpretace údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda zkoušená látka způsobila vývojovou neurotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

LITERATURA

1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kodaň, Dánsko, 13.–14. června 1995.

2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Dostupné na: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Dostupné na: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109, 79–91.

5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109, 101–111.

6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109, 93–100.

7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Dostupné na: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en].

9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Dostupné na: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12, 173–292.

11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8, 188–197.

13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14) Kapitola B.34 této přílohy, Jednogenerační zkouška toxicity pro reprodukci.

15) Kapitola B.35 této přílohy, Dvougenerační studie reprodukční toxicity.

16) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.

17) Kapitola B.31 této přílohy, Studie prenatální vývojové toxicity.

18) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Dostupné na: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Dostupné na: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19, 499–509.

23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38, 2–6.

24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27, 110–112.

25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13, 118–136.

26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24, 87–94.

30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčivých přípravků.

32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6, 433–439.

▼**M5**

33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20, 449–457.

34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13, 383–390.

35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58, 350–365.

36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7, 579–586.

37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17, 298–303.

38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12, 489-495.

39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23, 896–920.

40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Raven Press, New York, s. 67–100.

41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1, 53–66.

42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Raven Press, New York, s. 37–82.

43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15, 117-129.

44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18, 247-260.

45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19, 1997. 405–411.

47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64, 61–669.

48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40, 589–591.

49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287–351.

50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59, 107–128.

51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181–211.

▼**M5**

52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8, 199–211.

53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80, 25–30.

54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.,* 6, 437–445.

55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125–145.

56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105, 321–332.

57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6, 247–296.

58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10, 237–244.

59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103, 98–105.

60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17, 465–479.

61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11, 47–60.

62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48, 29–69.

63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36, 60–90.

64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9, 235–241.

65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20, 387–399.

66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10, 327–332.

67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71, 342–352.

68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.,* 36, 338–341.

69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28, 122–131.

70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.

71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24, 291–304.

73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874, 123–130.

74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53, 365–372.

75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19, 745–755.

77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20, 417–432.

78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 129–135.

79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57, 305–310.

81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609, 262–268.

82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26, 707–710.

83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22, 51–61.

84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130, 813–831.

85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49, 113–121.

86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84, 294–298.

87) Jensen, K.F., Catalano, S.M. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.

88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283, 70–74.

▼**M5**

89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287, 1056-1060.

90) Friede, R.L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63, 127–133.

92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104, 401–405.

93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.

94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5, 113–126.

97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8, 21–27.

98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6, 329–335.

99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12, 165–172.

100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14, 221–228.

101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7, 587–590.

102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26, 345–352.

103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34, 296–313.

104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3), 205–210.

105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41, 295–301.

106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 266–287.

107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 288–325.

▼**M5**

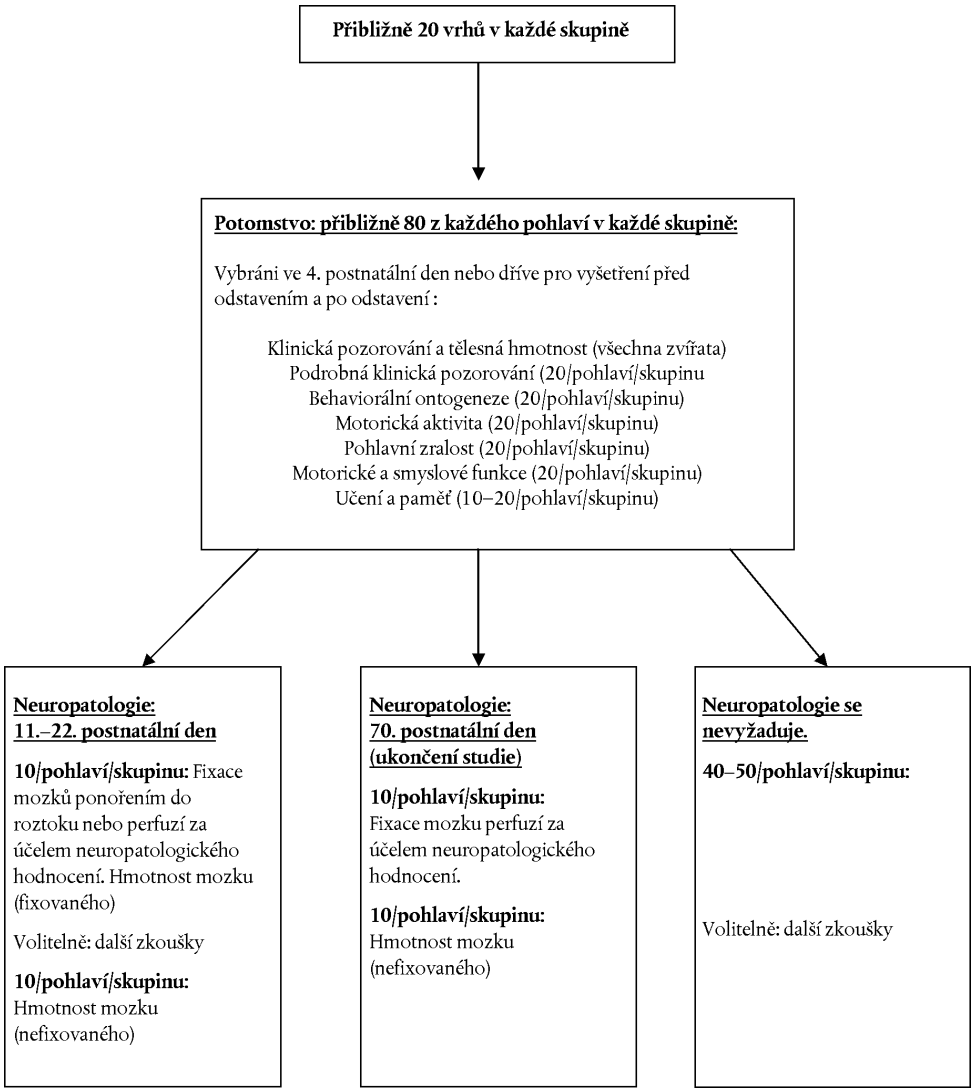
108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 326–348.

109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 349–381.

▼M5

Obrázek 1

Obecný zkušební plán funkčních/behaviorálních zkoušek, neuropatologického hodnocení a stanovení hmotností mozku. Tento diagram vychází z popisu uvedeného v odstavci 13–15 (PND = postnatální den). Příklady rozdělení zvířat jsou uvedeny v dodatku 1



▼M5

Dodatek 1

1. Příklady možného rozdělení jsou popsány a uvedeny v tabulce níže. Tyto příklady mají ukázat, že rozdělení zvířat v rámci studie podle různých zkušebních paradigmat může být provedeno několika různými způsoby.

Příklad č. 1

2. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 22. postnatální den humánně usmrtí 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení. Kromě toho se shromáždí údaje o hmotnosti mozku s použitím nefixovaných mozků ostatních 10 samců a 10 samic z každé úrovně dávky.

3. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro funkčně/behaviorální zkoušky po odstavení (podrobná klinická pozorování, motorická aktivita, úleková reakce na zvukový podnět a zkoušení poznávacích funkcí u dospívajících) a pro posouzení věku pohlavní zralosti. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek a zpracuje se pro neuropatologické hodnocení.

4. Pro zkoušky poznávacích funkcí u mladých dospělých (např. 60.–70. postnatální den) se použije třetí sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) při ukončení studie usmrtí a mozek se vyjme a zváží.

5. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny se ponechá v záloze pro případné další zkoušky.

Tabulka 1

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku, 22. postnatální den
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku, 22. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀	Podrobná klinická pozorování
		20 ♂ + 20 ♀	Motorická aktivita
		20 ♂ + 20 ♀	Pohlavní zralost
		20 ♂ + 20 ♀	Motorické a smyslové funkce
		20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (25. postnatální den)
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)

▼**M5**

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)
4	8	—	Zvířata v rezervě pro nahrazení nebo další zkoušky

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; sameči jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

Příklad č. 2

6. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 11. postnatální den 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) humánně usmrtí. Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení.

7. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro vyšetření po odstavení (podrobná klinická pozorování, motorická aktivita, posouzení věku pohlavní zralosti a motorické a smyslové funkce). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.

8. Pro testování poznávacích funkcí u dospívajících a mladých dospělých se použije 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Pro zkoušky poznávacích funkcí v 23. postnatální den a u mladých dospělých se použijí odlišná zvířata. Při ukončení se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která byla testována jako dospělá, usmrtí, mozek se vyjme a zváží.

9. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která nebyla vybrána pro zkoušky, se při odstavení usmrtí a vyloučí.

Tabulka 2

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Behaviorální ontogeneze Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku, 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Podrobná klinická pozorování Motorická aktivita Pohlavní zralost Motorické a smyslové funkce Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)

▼M5

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	10 ♂ + 10 ♀ [b]	Učení a paměť (23. postnatální den)
3	7	10 ♂ + 10 ♀ [b]	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých
4	8	—	Zvířata usmrcená a vyloučená, 21. postnatální den

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.
[b] Pro zkoušky poznávacích funkcí v 23. postnatální den a u mladých dospělých se použijí odlišná mláďata (např. ze sudých/lichých vrhů z celkového počtu 20 vrhů).

Příklad č. 3

10. Pro posouzení hmotnosti mozku a neuropatologie v 11. postnatální den se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 11. postnatální den 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) humánně usmrtí, mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení. Kromě toho se shromáždí údaje o hmotnosti mozku s použitím nefixovaných mozků ostatních 10 samců a 10 samic z každé úrovně dávky.

11. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro testování behaviorální ontogeneze (motorická aktivita), vyšetření po odstavení (motorická aktivita a posouzení věku pohlavní zralosti) a testování poznávacích funkcí u dospívajících.

12. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušky motorických a smyslových funkcí (úleková reakce na zvukový podnět) a pro podrobná klinická pozorování. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.

13. Další sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušení poznávacích funkcí u mladých dospělých. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) usmrtí při ukončení studie, mozek se vyjme a zváží.

Tabulka 3

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku v 11. postnatální den
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku v 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze (motorická aktivita)
		20 ♂ + 20 ♀	Motorická aktivita
		20 ♂ + 20 ♀	Pohlavní zralost
		20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (27. postnatální den)

▼**M5**

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	20 ♂ + 20 ♀	Úleková reakce (dospívající a mladí dospělí)
		20 ♂ + 20 ♀	Podrobná klinická pozorování
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den
4	8	20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí)
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku mladých dospělých

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

▼**M5**

Dodatek 2

Definice

Chemická látka: látka nebo směs.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

▼M5

B.54. UTEROTROFNÍ BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ESTROGENNÍCH VLASTNOSTÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 440 (2007). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat metodický návod pro provádění uterotrofní biologické zkoušky u hlodavců. Uterotrofní biologická zkouška u hlodavců poté prošla rozsáhlým validačním programem, který mimo jiné zahrnoval sestavení podrobného podkladového dokumentu (2)(3) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií, aby se prokázal význam a reprodukovatelnost biologické zkoušky s účinným referenčním estrogenem, slabými agonisty estrogenního receptoru, silným antagonistou estrogenního receptoru a negativní referenční chemickou látkou (4)(5)(6)(7)(8)(9). Tato zkušební metoda B.54 vychází ze zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z výsledků těchto zkoušek s agonisty estrogenů.

2. Uterotrofní biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška, která pochází z 30. let 20. století (27)(28) a standardizovanou screeningovou metodou se stala na základě rozhodnutí expertního výboru v roce 1962 (32)(35). Je založena na zvýšení hmotnosti dělohy neboli uterotrofní reakce (přehled viz 29). Hodnotí schopnost chemické látky vyvolávat biologické aktivity odpovídající agonistům nebo antagonistům přírodních estrogenů (např. 17-beta-estradiolu), avšak její použití pro zjištění antagonistních látek je mnohem méně obvyklé než pro zjištění agonistních látek. Děloha reaguje na estrogeny dvojím způsobem: Počáteční reakcí je zvýšení hmotnosti v důsledku nasáknutí vodou. Po této reakci následuje nárůst hmotnosti v důsledku růstu tkáně (30). Reakce dělohy u potkanů a u myší jsou kvalitativně srovnatelné.

3. Tato biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo* a na její provedení je třeba pohlížet v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (dodatek 2). V tomto koncepčním rámci je uterotrofní biologická zkouška zařazena na úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jediném endokrinním mechanismu, tj. estrogenitě.

4. Předpokládá se zařazení uterotrofní biologické zkoušky do baterie zkoušek *in vitro* a *in vivo* za účelem zjištění chemických látek schopných interakce s endokrinním systémem, která nakonec bude sloužit k posouzení rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí. V rámci validačního programu OECD byli používáni silní a slabí agonisté estrogenu s cílem zhodnotit schopnost zkoušky identifikovat estrogenní chemické látky (4)(5)(6)(7)(8). Tímto způsobem byla jasně prokázána citlivost tohoto zkušebního postupu z hlediska agonistů estrogenu, jakož i dobrá vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost.

5. Pokud jde o negativní chemické látky, byla do validačního programu zařazena pouze jedna „negativní“ referenční chemická látka, u které byly známy negativní výsledky z uterotrofní zkoušky a dalších zkoušek *in vitro* s využitím receptorů a vazby na receptory. Avšak byly zhodnoceny i další zkušební údaje nesouvisející s validačním programem OECD, jež dále podpořily specifičnost uterofrofní biologické zkoušky pro screening agonistů estrogenů (16).

▼M5

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Agonisté a anatagonisté estrogenů působí jako ligandy pro alfa a beta receptory estrogenů a mohou aktivovat nebo potlačovat transkripční aktivitu receptorů. To může potenciálně vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty estrogenů. Afinita ligandu k estrogenovému receptoru nebo aktivace transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, je pouze jedním z několika určujících faktorů možného nebezpečí. Jiné určující faktory mohou zahrnovat aktivaci a deaktivaci metabolismu po vstupu do organismu, distribuci do cílových tkání a odstranění z těla, což přinejmenším zčásti závisí na způsobu podávání a na zkoušené chemické látce. Z toho vyplývá potřeba zjištění možné aktivity chemické látky *in vivo* za určitých podmínek, pokud dostatečné informace neposkytují již vlastnosti ADME (absorpce – distribuce – metabolismus – eliminace) dané chemické látky. Děložní tkáně reagují na stimulaci estrogeny rychlým a mohutným růstem, zejména u laboratorních hlodavců, kde estrální cyklus trvá přibližně čtyři dny. Druhy hlodavců, zejména potkan, se rovněž široce používají ve studiích toxicity za účelem charakterizace nebezpečí. Děloha hlodavců je proto vhodným cílovým orgánem pro zjišťování estrogenních agonistů a antagonistů *in vivo*.

7. Tato zkušební metoda je založena na postupech použitých při validační studii OECD, u kterých byla při vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studiích prokázána jejich spolehlivost a opakovatelnost. V současné době jsou k dispozici dvě metody, a sice metoda používající dospělé samice s odstraněnými vaječníky a metoda s použitím nezralých mláďat bez odstranění vaječníků. V rámci programu validačních zkoušek OECD bylo prokázáno, že obě metody mají srovnatelnou citlivost a reprodukovatelnost. Nezralé mládě, protože má intaktní hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osu, je ovšem poněkud méně specifické, avšak umožňuje širší rozsah vyšetření než zvíře s odstraněnými vaječníky, jelikož může reagovat na chemické látky, které interagují s HPG osou, a nikoli pouze s estrogenním receptorem. HPG osa potkana je funkční přibližně ve věku 15 dnů. Předtím nelze pubertu urychlit, např. podáváním hormonu uvolňujícího gonadotropiny. Jak samice začínají dosahovat puberty, budou mít před otevřením vaginy několik tichých cyklů, které nevedou k vaginálnímu otevření nebo k ovulaci, ale v organismu probíhají určité hormonální výkyvy. Jestliže určitá chemická látka přímo či nepřímo stimuluje HPG osu, vede to k předčasné pubertě, časné ovulaci a urychlenému vaginálnímu otevření. Takové účinky mohou být vyvolány nejen chemickými látkami prostřednictvím působení na HPG osu, ale podobný účinek může mít i určitý typ potravy. Některé diety s vyšší úrovní metabolizovatelné energie mohou stimulovat růst a urychlovat vaginální otevření, aniž by byly přímo estrogenní. U dospělých zvířat s odstraněnými vaječníky by takové chemické látky nevyvolávaly uterotrofní reakci, jelikož jejich HPG osa nefunguje.

8. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty by měla být upřednostňována metoda používající nezralé potkany, kdy nedochází k chirurgické předúpravě zvířat a nedochází také k případnému nepoužití těch zvířat, která vykazují příznaky estru (říje) (viz odstavec 30).

▼M5

9. Uterotrofní reakce není čistě estrogenního původu, tj. reakci mohou vyvolat i jiné chemické látky než agonisté nebo antagonisté estrogenů. Například ke stimulativní reakci mohou vést poměrně vysoké dávky progesteronu, testosteronu nebo různých syntetických progestinů (30). Jakoukoli reakci lze analyzovat histologicky z hlediska keratinizace a kornifikace vaginy (30). Bez ohledu na možný původ reakce by pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky měl běžně vyvolat kroky zaměřené na další vyjasnění. Další poznatky o estrogenitě by mohly přinést studie *in vitro*, jako jsou studie vazby na estrogenní receptory a studie transkripční aktivace, nebo jiné *in vivo* studie, jako např. studie puberty u samic.

10. Vzhledem k tomu, že uterotrofní biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo*, byla při validaci zaměřena pozornost hlavně na dobré zacházení se zvířaty a stupňovitou strategii zkoušení. Proto bylo úsilí zaměřeno na přísné ověření reprodukovatelnosti a citlivosti zkoušky na estrogenitu – což je hlavním zájmem u mnoha chemických látek – a složce antiestrogenity této zkoušky byla věnována malá pozornost. Zkoušen byl pouze jeden antiestrogen se silným působením, jelikož počet chemických látek s jasným antiestrogenním profilem (nezastíněným určitým estrogenním působením) je velmi omezený. Tato zkušební metoda je tudíž určena pro estrogenní protokol a protokol popisující antagonistní stránku zkoušky je obsažen v Pokynech (37). Reprodukovatelnost a citlivost zkoušky v případě chemických látek s čistě antiestrogenním působením bude přesněji stanovena později, až bude tento zkušební postup po nějakou dobu běžně používán a bude identifikováno více chemických látek s tímto druhem působení.

11. Má se za to, že veškeré postupy založené na zvířatech budou splňovat normy jednotlivých zemí v oblasti péče o zvířata. Popis péče a zacházení, který je stanoven níže, představuje minimální požadavky a bude nahrazen místními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (25).

12. Stejně jako u všech zkoušek používajících živá zvířata je nezbytné před zahájením zkoušek zajistit, že údaje jsou skutečně nezbytné. Dvě podmínky, kdy mohou být údaje nutné, jsou například tyto:

— vysoký expoziční potenciál (úroveň 1 koncepčního rámce, dodatek 2) nebo příznaky estrogenity (úroveň 2), aby se zjistilo, zda takový účinek může nastat *in vivo*,

— účinky naznačující estrogenitu na úrovni 4 nebo 5 zkoušení *in vivo*, aby se potvrdilo, že tyto účinky souvisely s estrogenním mechanismem, který nelze objasnit použitím zkoušky *in vitro*.

13. Definice použité při této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M5

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Uterotrofní biologická zkouška je z hlediska své citlivosti založena na systému testování zvířat, při kterém hypothalamo-hypofýzo-ovariální osa není funkční, což vede k nízkým endogenním úrovním cirkulujícího estrogenu. To zajistí nízkou výchozí hmotnost dělohy a maximální šíři reakce na podávané estrogeny. Tento požadavek splňují dva stavy samic hlodavců, kdy jsou citlivé na estrogeny:

i) nezralé samice po odstavení a před pubertou; a

ii) mladé dospělé samice po odstranění vaječníků s dostatečnou dobou na to, aby se děložní tkáně mohly vrátit do původního stavu.

15. Zkoušená chemická látka je podávána denně žaludeční sondou nebo subkutánní injekcí. Odstupňované dávky zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálním skupinám (pro pokyny viz odstavec 33) pokusných zvířat s použitím jedné úrovně dávky na každou skupinu a dobou aplikace tři po sobě jdoucí dny v případě použití metody nezralých mláďat a nejméně tři po sobě jdoucí dny v případě metody dospělého zvířete s odstraněnými vaječníky. Přibližně 24 hodin po poslední dávce se zvířata podrobí pitvě. U agonistů estrogenu se posoudí střední hmotnost dělohy experimentálních skupin zvířat v porovnání se skupinou s vehikulem s cílem zjistit, zda došlo ke statisticky významnému zvýšení. Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy experimentální skupiny ukazuje na pozitivní reakci v této biologické zkoušce.

POPIS METODY

Výběr druhu zvířat

16. Lze použít běžně užívané kmeny laboratorních hlodavců. Při validaci byly například použity kmeny potkanů Sprague-Dawley a Wistar. Neměly by se používat kmeny, o kterých se ví nebo předpokládá, že mají méně reaktivní dělohu. Laboratoř by měla prokázat citlivost použitého kmene, jak je popsáno v odstavcích 26 a 27.

17. Od 30. let 20. století jsou k uterotrofní biologické zkoušce běžně používáni potkani a myši. Validační studie OECD byly prováděny pouze na potkanech na základě toho, že existuje obecná shoda, jež předpokládá, že oba druhy jsou rovnocenné, a proto by v zájmu úspory zdrojů a zvířat měl pro celosvětové ověření postačovat jeden druh. Ve většině studií reprodukční a vývojové toxicity je zvoleným druhem potkan. Vzhledem k tomu, že u myší existuje rozsáhlá historická databáze a aby působnost zkušební metody pro provádění uterotrofní biologické zkoušky na hlodavcích byla rozšířena i na použití myší jako zkušebního druhu, byla provedena zkrácená následná validační studie na myších (16). V souladu s původním záměrem úspory zdrojů a zvířat byl vybrán překlenovací přístup s omezeným počtem zkoušených chemických látek, zúčastněných laboratoří a bez testování kódovaných vzorků. Tato překlenovací validační studie ukazuje, že v případě uterotrofní biologické zkoušky na mladých dospělých myších s odstraněnými vaječníky jsou údaje získané u potkanů a myší kvalitativně i kvantitativně v souladu. To umožňuje v případech, kdy výsledek uterotrofní biologické zkoušky může předcházet dlouhodobé studii, použít v obou studiích zvířata stejného kmene a původu. Překlenovací přístup byl omezen na myši s odstraněnými vaječníky a zpráva neposkytuje spolehlivý soubor údajů pro ověření modelu s nezralými mláďaty, a tudíž model s nezralými mláďaty u myší se do stávající zkušební metody nezahrnuje.

▼M5

18. V některých případech tedy mohou být místo potkanů použity myši. Výběr tohoto druhu je třeba zdůvodnit na základě toxikologických, farmakokinetických a/nebo jiných kritérií. U myší mohou být nezbytné změny v testovacím postupu. Například spotřeba potravy na základě tělesné hmotnosti je u myší vyšší než u potkanů, a obsah fytoestrogenu v potravě by proto měl být u myší nižší než u potkanů (9)(20)(22).

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat místním normám péče o laboratorní zvířata. Zde uvedené popisy péče a zacházení představují minimální požadavky a budou nahrazeny místními právními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem by měla být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

20. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata *ad libitum*. Mladá dospělá zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po skupinách, maximálně tříčlenných. Vzhledem k nízkému věku nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách.

21. Je známo, že vysoká úroveň fytoestrogenů v laboratorní stravě zvyšuje hmotnost dělohy u hlodavců v míře, která může narušit uterotrofní biologickou zkoušku (13)(14)(15). Vysoká úroveň fytoestrogenů a metabolizovatelné energie v laboratorní stravě může mít rovněž za následek časný nástup puberty, jestliže se používají nezralá zvířata. Přítomnost fytoestrogenů vyplývá především ze zařazení produktů ze sóji a vojtěšky do laboratorní stravy a ukázalo se, že koncentrace fytoestrogenů v jednotlivých šaržích standardní laboratorní stravy je různá (23). Důležitou proměnnou je tělesná hmotnost, neboť množství spotřebované potravy souvisí s tělesnou hmotností. Skutečná dávka spotřebovaných fytoestrogenů ze stejné stravy se proto může lišit podle druhu a podle věku (9). U nezralých samic potkana může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně dvojnásobně vyšší než u mladých dospělých samic s odstraněnými vaječníky. U mladých dospělých myší může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně čtyřnásobně vyšší než u mladých dospělých samic potkana s odstraněnými vaječníky.

22. Výsledky uterotrofní biologické zkoušky (9)(17)(18)(19) však ukazují, že omezené množství fytoestrogenů ve stravě je přijatelné a nesnižuje citlivost biologické zkoušky. Určitým vodítkem může být, že u nezralých samic potkana Sprague-Dawley a Wistar by úroveň fytoestrogenů ve stravě neměla přesáhnout 350 μg ekvivalentů genisteinu na gram laboratorní stravy (6)(9). Taková strava by měla být vhodná i při zkouškách na mladých dospělých potkanech s odstraněnými vaječníky, protože spotřeba potravy měřená na jednotku tělesné hmotnosti je u mladých dospělých nižší než u nezralých zvířat. Mají-li být použity dospělé myši s odstraněnými vaječníky nebo potkani citlivější na fytoestrogeny, musí být zváženo úměrné snížení úrovně fytoestrogenů v stravě (20). Rozdíly v dostupné metabolizovatelné energii z různé stravy navíc mohou vést k časovým posunům v nástupu puberty (21)(22).

▼M5

23. Před studií je nutný pečlivý výběr stravy bez zvýšené úrovně fytoestrogenů (jako vodítko viz (6)(9)) nebo zvýšené úrovně metabolizovatelné energie, jež mohou zkreslit výsledky (15)(17)(19)(22)(36). Pro zajištění náležité výkonnosti zkušebního systému, který laboratoř použije, jak stanoví odstavec 26 a 27, je důležité zkontrolovat oba tyto faktory. Pro jistotu by v souladu se zásadami správné laboratorní praxe (SLP) měly být z každé sady stravy podávané během studie odebrány reprezentativní vzorky pro případnou analýzu obsahu fytoestrogenů (např. v případě vysoké kontrolní hmotnosti dělohy ve srovnání s historickými kontrolami nebo nepřiměřené reakce na referenční estrogen, 17-alfa-ethinylestradiol). Vzorky by měly být analyzovány během studie nebo zmrazené na –20 °C nebo ošetřené takovým způsobem, aby se zabránilo změně složení před analýzou.

24. Některá steliva mohou obsahovat přirozeně se vyskytující estrogenní nebo antiestrogenní chemické látky (např. je známo, že kukuřičný klas ovlivňuje cykličnost u potkanů a podle všeho je antiestrogenní). Zvolené stelivo by mělo obsahovat minimální úroveň fytoestrogenů.

Příprava zvířat

25. Pokusná zvířata bez příznaků jakékoli choroby nebo fyzických abnormalit se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nezralá zvířata by během aklimatizace měla být pokud možno umístěna do klecí s matkami nebo adoptivními matkami až do odstavení. Doba aklimatizace před zahájením studie by u mladých dospělých zvířat a u nezralých zvířat dodaných spolu s matkami nebo adoptivními matkami měla trvat přibližně 5 dnů. Pokud jsou nezralá zvířata získána jako odstavená mláďata bez matek, může se stát, že dobu aklimatizace bude nutné zkrátit, jelikož podávání dávek by mělo začít bezprostředně po odstavení (viz odstavec 29).

POSTUP

Ověření odborné způsobilosti laboratoře

26. Odbornou způsobilost laboratoře lze ověřit dvěma různými způsoby:

— pravidelné ověřování založené na počáteční výchozí studii s pozitivní kontrolní látkou (viz odstavec 27). Nejméně každých 6 měsíců – a pokaždé, když dojde ke změně, která může ovlivnit provedení studie (např. nové složení stravy, změna personálu provádějícího sekce, změna kmene nebo dodavatele zvířat apod.) – by měla být ověřena reakční schopnost zkušebního systému (modelu zvířat) pomocí vhodné dávky (na základě výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou popsané v odstavci 27) referenčního estrogenu: 17-alfa-ethinylestradiolu (číslo CAS 57-63-6)(EE).

— použití souběžných kontrol tak, že se do každé zkoušky zařadí skupina, které je podávána vhodná dávka referenčního estrogenu.

Jestliže systém nereaguje podle očekávání, měly by se zkušební podmínky přezkoumat a odpovídajícím způsobem upravit. Doporučuje se, aby dávka referenčního estrogenu, která má být použita při každém postupu, byla přibližně 70 až 80 ED.

▼M5

27. **Výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou.** Dříve, než laboratoř provede poprvé studii podle této zkušební metody, měla by být prokázána odborná způsobilost laboratoře zkouškou reakční schopnosti daného modelu zvířat, při které se vyvolá reakce na dávku referenčního estrogenu: 17-alfa-ethinylestradiolu (číslo CAS 57-63-6) (EE) s aplikací nejméně čtyř dávek. Odpověď hmotnosti dělohy bude porovnána se zjištěnými historickými údaji (viz odkaz (5)). Pokud tato výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou nedá předpokládané výsledky, měly by se přezkoumat a upravit zkušební podmínky.

Počet a stav zvířat

28. Každá pokusná a kontrolní skupina by měla zahrnovat nejméně 6 zvířat (pro oba protokoly metody nezralých mláďat a metody dospělých s odstraněnými vaječníky).

Věk nezralých zvířat

29. U uterotrofní biologické zkoušky s nezralými zvířaty musí být uveden den narození. Podávání dávek by mělo začít dostatečně brzy, aby se zajistilo, že na konci podávání zkoušené chemické látky ještě nedojde k fyziologickému růstu endogenních estrogenů spojenému s pubertou. Na druhé straně existují poznatky, že velmi mladá zvířata mohou být méně citlivá. Pro stanovení optimálního věku by každá laboratoř měla vzít v úvahu své vlastní podkladové údaje o dozrávání.

Jako všeobecné vodítko lze uvést, že u potkanů lze začít s podáváním dávek ihned po časném odstavení v 18. postnatální den (přičemž den narození je postnatálním dnem 0). Podávání dávek u potkanů by mělo být ukončeno v 21. postnatální den, ale v každém případě před 25. postnatálním dnem, protože po dosažení tohoto věku se hypothalamo-hypofýzo-ovariální osa stává funkční a úroveň endogenního estrogenu může začít růst, což je doprovázeno růstem průměrné základní hmotnosti dělohy a nárůstem směrodatných odchylek ve skupinách (2)(3)(10)(11)(12).

Postup odstranění vaječníků

30. U samic potkana a myši (experimentální skupina a kontrolní skupina), kterým mají být odstraněny vaječníky, by k odstranění vaječníků mělo dojít mezi 6. a 8. týdnem věku. U potkanů by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 14 dnů, aby se umožnil návrat dělohy do minimálního, stabilního výchozího stavu. U myší by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 7 dnů. Jelikož pro vyvolání významné cirkulující úrovně estrogenů (3) postačí malé množství tkáně vaječníků, zvířata by před použitím měla být nejméně po pět po sobě jdoucích dnů (např. u potkanů v 10.–14. den po odstranění vaječníků) zkoušena pozorováním epiteliálních buněk získaných výtěrem z vaginy. Pokud zvířata vykazují jakékoli příznaky, že vstupují do estru, neměla by být použita. Dále by při pitvě měly být zkoumány zbytky vaječníků, zda neexistují příznaky přítomnosti vaječníkové tkáně. Pokud ano, dané zvíře by nemělo být použito pro výpočty (3).

31. Při zahájení postupu odstranění vaječníků je zvíře ve ventrální poloze poté, co bylo řádně anestetizováno. Řez otevírající dorzo-laterální stěnu břišní by měl být přibližně 1 cm dlouhý, od středu mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní a několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Vaječník se vyjme z břišní dutiny a položí na aseptickou podložku. Vaječník se oddělí ve spojení vejcovodu s tělem dělohy. Po ujištění, že nedochází k masivnímu krvácení, by břišní stěna měla být uzavřena suturou a kůže klipsy nebo vhodným stehem. Místa podvazu jsou schematicky ukázány na obrázku 1. Mělo by být použito vhodné pooperační tišení bolesti v souladu s doporučením veterinárního lékaře se zkušenostmi v oblasti péče o hlodavce.

▼M5

Tělesná hmotnost

32. Při metodě dospělých samic s odstraněnými vaječníky tělesná hmotnost a hmotnost dělohy spolu nekorelují, protože hmotnost dělohy je ovlivňována hormony, např. estrogeny, ale nikoli růstovými faktory, které regulují velikost těla. Naopak v modelu s nezralými zvířaty tělesná hmotnost s hmotností dělohy souvisí, dokud dospívají (34). V okamžiku zahájení studie by tak v modelu nezralých zvířat měla být odchylka v jejich hmotnosti minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti. To znamená, že velikost vrhu by měla být chovatelem standardizována, aby se zajistilo, že potomstvo různých mateřských zvířat bude krmeno přibližně stejně. Zvířata by měla být přiřazena ke skupinám (kontrolním a experimentálním) náhodným rozdělením z hlediska hmotnosti, takže střední tělesná hmotnost každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k přiřazení sourozenců z vrhu do stejné experimentální skupiny, pokud možno bez zvyšování počtu vrhů, jež mají být používány při vyšetřeních.

Dávkování

33. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít estrogenní účinek *in vivo*, běžně postačí dvě exponované skupiny a jedna kontrolní skupina, a s ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je proto upřednostňováno toto uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-odpověď nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně tři exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjištění estrogenního působení (např. odhad potence), měl by být zvážen odlišný režim dávkování. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině ve stejném objemu, který byl použit v experimentálních skupinách (nebo v nejvyšším objemu použitém v exponovaných skupinách, pokud je u jednotlivých skupin rozdílný).

34. V případě uterotrofní biologické zkoušky je cílem vybrat dávky, které zaručují přežití zvířat a nezpůsobují významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí tří po sobě jdoucích dnů podávání chemické látky, až do maximální dávky 1 000 mg/kg/den. Při výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla především zohlednit hodnotu LD50 a/nebo informace o akutní toxicitě, aby nedošlo k úmrtí, vážnému poškození nebo utrpení zvířat (24)(25)(26). Nejvyšší dávka by měla představovat maximální tolerovanou dávku; přijata by byla i studie provedená s úrovní dávky, jež vyvolala pozitivní uterotrofní reakci. V rámci screeningu jsou obecně přijatelné velké intervaly v dávkování (např. jedna polovina logaritmických jednotek, což odpovídá zvyšování dávky po 3,2, nebo dokonce až do 1 logaritmické jednotky). Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek, aby se podle ní určily dávky, které mají být použity.

35. Alternativně, pokud může být estrogenní potence agonistní látky odhadnuta podle údajů získaných *in vitro* (nebo *in silico*), mohou být pro výběr dávky vzaty v úvahu tyto údaje. Například množství zkoušené chemické látky, které by vyvolalo uterotrofní reakce ekvivalentní referenční agonistní látce (ethinylestradiolu), se odhaduje podle jejích relativních *in vitro* potencí vůči ethinylestradiolu. Nejvyšší zkušební dávka by byla získána vynásobením této ekvivalentní dávky vhodným koeficientem, např. 10 nebo 100.

▼M5

Experimentální zjištění rozmezí dávek

36. V případě nutnosti může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek na několika zvířatech. V této souvislosti lze použít Pokyn OECD č. 19 (25), který stanoví klinické příznaky ukazující na toxicitu nebo utrpení zvířat. Je-li to v rámci této předběžné studie možné, pak po třech dnech podávání lze přibližně po 24 hodinách od poslední dávky vyjmout dělohy a zvážit je. Tyto údaje by poté mohly být použity jako pomocné údaje pro naplánování hlavní studie (vybrat přijatelnou nejvyšší a nejnižší dávku a doporučit počet exponovaných skupin).

Podávání látky

37. Zkoušená chemická látka je podávána ústní sondou nebo subkutánní injekcí. Při volbě způsobu podávání musí být zohledněny zásady dobrého zacházení se zvířaty, jakož i toxikologické aspekty, jako je vhodnost zvoleného způsobu podávání z hlediska expozice člověka dané chemické látce (např. ústní sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, a zvláště pak existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při konkrétním způsobu podávání).

38. Kdykoliv to bude možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však většina estrogenních ligandů nebo jejich metabolických prekursorů má tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Tyto oleje však mají různou kalorickou hodnotu a obsah tuku, a vehikulum by tak mohlo ovlivnit celkový příjem metabolizovatelné energie, což by mohlo změnit měřené sledované vlastnosti, např. hmotnost dělohy, zvláště při použití metody s nezralými zvířaty (33). Každé vehikulum, které má být použito, by mělo být před studií testováno oproti kontrolní skupině bez vehikula. Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit na konečnou pracovní koncentraci ve zkušebním vehikulu. Musí být známa toxická charakteristika daného rozpouštědla a měla by být prověřena na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stabilní, lze rozpuštění zkoušené chemické látky napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být určena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden zásobní roztok zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování.

39. Nastavení dávkování bude záviset na použitém modelu (viz odstavec 29 o modelu nezralých zvířat a odstavec 30 o modelu dospělých zvířat s odstraněnými vaječníky). Nezralým samicím potkana se denně podává zkoušená chemická látka po dobu tří po sobě jdoucích dnů. Třídenní expozice se doporučuje také u samic potkana s odstraněnými vaječníky, ale delší expozice jsou přijatelné a mohou zlepšit detekci slabě působících chemických látek. U samic myší s odstraněnými vaječníky by aplikace po dobu 3 dnů měla být dostatečná s tím, že prodloužení až na sedm dnů by v případě silných agonistů estrogenů nepřineslo významnou výhodu. Avšak u slabých estrogenů podle výsledků validační studie (16) toto neplatí a dávkování u dospělých myší s odstraněnými vaječníky by mělo být prodlouženo až na 7 po sobě jdoucích dnů.Dávky je třeba podávat každý den přibližně ve stejnou dobu. Měly by být přizpůsobeny tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (např. miligram zkoušené chemické látky na kilogram tělesné hmotnosti za den). Pokud jde o zkušební objem, jeho variabilita by na základě tělesné hmotnosti měla být minimalizována nastavením koncentrací podávaného roztoku tak, aby byl zajištěn konstantní objem ve vztahu k tělesné hmotnosti při všech úrovních dávky a při jakémkoli způsobu podávání.

▼M5

40. Pokud se zkoušená chemická látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné denní dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny týkající se péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

41. Pokud se zkoušená chemická látka podává subkutánní injekcí, podává se v jedné denní dávce. Dávky by měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, rozdělený do dvou míst vpichu, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Pozorování

Obecná a klinická pozorování

42. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Mělo by se provádět každý den nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Provede se prohlídka všech zvířat za účelem zjištění mortality, morbidity a obecných klinických příznaků, jako jsou změny chování, změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

43. Všechna zvířata by se měla denně zvážit s přesností na 0,1 g, první vážení by mělo být provedeno těsně před zahájením aplikace, tj. když jsou zvířata rozdělena do skupin. Alternativně lze měřit množství potravy spotřebované během doby aplikace na každou klec zvážením krmítek. Výsledky spotřeby potravy by měly být vyjádřeny v gramech na jednoho potkana za den.

Sekce a měření hmotnosti dělohy

44. Po 24 hodinách od poslední aplikace se potkani humánně usmrtí. Ideálně bude pořadí pitev určeno náhodným výběrem mezi skupinami, aby nedošlo k přímému postupu od nejméně exponované skupiny k nejvíce exponované skupině, či naopak, což by mohlo poněkud ovlivnit údaje. Cílem biologické zkoušky je změřit hmotnost dělohy ve vlhkém a vysušeném stavu. Hmotnost ve vlhkém stavu zahrnuje dělohu a obsah luminální tekutiny. Hmotnost ve vysušeném stavu se měří po vytlačení a odstranění luminálního obsahu.

45. Před sekcí bude vyšetřena vagina, jaký je stav jejího otevření u nezralých zvířat. Postup sekce začíná otevřením břišní stěny počínaje od srůstu stydké kosti. Poté se od dorzální břišní stěny oddělí roh dělohy a vaječníky. Od ventrální a laterální strany dělohy a vaginy se oddělí močový měchýř a močovody. Odděluje se fibrózní adheze mezi rektem a vaginou dokud nelze identifikovat spojení poševního vchodu s perineální kůží. Děloha a vagina se oddělí od těla naříznutím poševní stěny těsně nad spojením mezi perineální kůží, jak je ukázáno na obrázku 2. Děloha by měla být oddělena od bočního svalstva jemným odříznutím děložního okruží v bodě

▼M5

jeho připojení po celé délce dorzálně laterálního aspektu každého děložního rohu. Po oddělení od těla by s dělohou mělo být zacházeno dostatečně rychle, aby se zamezilo vysychání tekutin. U malých tkání, jako je děloha, ztráta hmotnosti v důsledku vysychání nabývá na významu (23). Jsou-li přítomny vaječníky, oddělí se ve vejcovodu, čímž se zamezí ztráty luminální tekutiny z děložního rohu. Pokud byly u zvířete vaječníky odstraněny, měly by být pahýly vyšetřeny, zda nejsou přítomny tkáně vaječníků. Přebytečný tuk a spojovací tkáň by měly být odstraněny. Vagina se oddělí od dělohy těsně pod děložním hrdlem, takže hrdlo zůstane s tělem dělohy, jak je ukázáno na obrázku 2.

46. Každá děloha by měla být přenesena do jednoznačně označené a zvážené nádobky (např. Petriho misky nebo plastové misky vah), přičemž je nadále třeba dbát na to, aby nedošlo k vysychání před zvážením (např. do nádobky lze umístit filtrační papír slabě navlhčený fyziologickým roztokem). Děloha s luminální tekutinou se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vlhkém stavu).

47. Každá děloha pak bude jednotlivě zpracována za účelem odstranění luminální tekutiny. Oba děložní rohy budou propíchnuty nebo podélně rozříznuty. Děloha se položí na slabě zvlhčený filtrační papír (např. Whatman č. 3) a jemně se stlačí druhým kusem slabě navlhčeného filtračního papíru tak, aby luminální tekutina byla zcela odstraněna. Děloha bez luminálního obsahu se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vysušeném stavu).

48. Hmotnost dělohy při ukončení studie lze použít pro potvrzení toho, že nebyl překročen vhodný věk u nezralého intaktního potkana, avšak rozhodující v tomto směru jsou historické údaje o kmeni potkanů použitém laboratoří (viz odstavec 56 pro interpretaci výsledků).

Volitelná vyšetření

49. Po zvážení může být děloha fixována do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu, aby po zbarvení hemotoxylinem a eosinem (HE) mohla být podrobena histopatologickému vyšetření. Vaginu lze vyšetřit odpovídajícím způsobem (viz odstavec 9). Dále může být provedeno morfometrické měření endometriálního epitelu za účelem kvantitativního srovnání.

ÚDAJE A ZPRÁVY

Údaje

50. Údaje o studii by měly zahrnovat:

— počet zvířat na začátku studie,

— počet a identifikaci zvířat nalezených uhynulých nebo zvířat utracených během zkoušky z humánních důvodů a datum a čas každého úmrtí nebo humánního usmrcení,

— počet a identifikaci zvířat vykazujících příznaky toxicity a popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, doby trvání a závažnosti toxických účinků, a

— počet a identifikaci zvířat vykazujících léze a popis typu lézí.

▼M5

51. U jednotlivých zvířat by měly být zaznamenány údaje o tělesné hmotnosti, hmotnosti dělohy ve vlhkém stavu a hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu. Jednotné statistické analýzy agonistních látek by měly být použity ke stanovení toho, zda podávání zkoušené chemické látky vedlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení hmotnosti dělohy. Měly by být provedeny vhodné statistické analýzy za účelem zjištění, zda v souvislosti s aplikací došlo ke změnám hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu. Údaje lze například hodnotit pomocí metody analýzy kovariance (ANCOVA), kdy kovariátou (doprovodnou proměnnou) bude tělesná hmotnost při pitvě. Před analýzou údajů lze provést logaritmickou transformaci údajů o děloze stabilizující rozptyl. Pro provedení párových srovnání každé exponované skupiny s kontrolními skupinami, kterým bylo podáváno vehikulum, a pro výpočet intervalů spolehlivosti je vhodné použít Dunnettova a Hsuova testu. Pro zjištění případných odlehlých hodnot a posouzení homogenity rozptylů lze použít metodu *Studentised residual plots*. Tyto postupy byly použity ve validačním programu OECD za použití postupu PROC GLM v systému statistické analýzy (SAS Institute, Cary, NC), verze 8 (6)(7).

52. Závěrečná zpráva musí obsahovat:

Zkušební zařízení:

— odpovědní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— údaje z výchozí zkoušky s pozitivní kontrolní látkou a údaje z pravidelných pozitivních kontrol (viz odstavce 26 a 27).

Zkoušená chemická látka:

— charakterizace zkoušených chemických látek,

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— metoda a frekvence přípravy roztoků,

— veškeré získané údaje o stabilitě,

— veškeré analýzy roztoků použitých k aplikaci

Vehikulum:

— charakterizace vehikula použitého při zkoušce (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— druh a kmen a zdůvodnění jejich výběru,

— dodavatel a konkrétní dodavatelské zařízení,

— věk při dodání s datem narození,

— v případě nezralých zvířat, zda byla dodána s matkou nebo adoptivní matkou, či nikoli, a datum odstavení,

— podrobnosti o postupu aklimatizace zvířat,

— počet zvířat v každé kleci,

— podrobnosti a metoda identifikace jednotlivých zvířat a skupin.

Podmínky zkoušky:

— podrobnosti o procesu náhodného výběru (tj. použitá metoda),

— zdůvodnění výběru dávek,

▼M5

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky, její dosažené koncentrace, stabilita a homogenita,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,

— strava (název, typ, dodavatel, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),

— zdroj vody (např. vodovodní voda nebo filtrovaná voda) a dodávka (potrubím z velké nádrže, v lahvích apod.),

— stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),

— záznam o podmínkách chovu v kleci, interval osvětlení, teplota a vlhkost v místnosti, úklid místnosti,

— podrobný popis postupů pitvy a vážení dělohy,

— popis statistických postupů.

Výsledky

U jednotlivých zvířat:

— všechny denní tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat (od přidělení do skupin až do pitvy) (s přesností na 0,1 g),

— věk každého zvířete (ve dnech, den narození se počítá jako den 0) při zahájení podávání zkoušené chemické látky,

— datum a čas podání každé dávky,

— vypočtený objem a velikost podávaných dávek a pozorování ztrát látky během podávání nebo po podání,

— denní záznamy o stavu zvířete, včetně významných příznaků a pozorování,

— předpokládaná příčina smrti (pokud byla zvířata během studie nalezena ve stavu agónie nebo uhynulá),

— datum a čas humánního usmrcení s časovým intervalem od posledního podání dávky,

— hmotnost dělohy ve vlhkém stavu (s přesností na 0,1 mg) a jakékoli zjištěné ztráty luminální tekutiny během sekce a přípravy na vážení,

— hmotnost dělohy ve vysušeném stavu (s přesností na 0,1 mg).

U každé skupiny zvířat:

— průměrná denní tělesná hmotnost (s přesností na 0,1 g) a směrodatná odchylka (od přiřazení ke skupinám až do pitvy),

— průměrná hmotnost vlhké dělohy a průměrná hmotnost usušené dělohy (s přesností na 0,1 mg) a směrodatné odchylky,

— denní spotřeba potravy, je-li měřena (vypočítaná jako gramy spotřebované potravy na každé zvíře),

▼M5

— výsledky statistických analýz srovnávajících hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu u experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem,

— výsledky statistické analýzy srovnávající celkovou tělesnou hmotnost a přírůstek tělesné hmotnosti experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem.

53. Shrnutí důležitých aspektů zkušební metody, které mohou sloužit jako vodítko

	Potkani	**Myši**
	Zvířata	
Kmen	Běžně užívaný kmen laboratorních hlodavců	
Počet zvířat	Nejméně 6 zvířat v každé exponované skupině	
Počet skupin	Nejméně 2 zkušební skupiny (viz pokyny v odstavci 33) a 1 skupina negativní kontroly Pokyny týkající se skupin pozitivní kontroly viz odstavec 26 a 27)	
	Podmínky chovu a krmení	
v místnosti pro zvířata	22 °C ± 3 °C	
Relativní vlhkost	50–60 %, nejméně 30 % a nejvýše 70 %	
Denní střídání osvětlení	12 hodin světla, 12 hodin tmy	
Strava a pitná voda	Ad libitum	
Chov	Jednotlivě nebo ve skupinách až do tří zvířat (u nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách)	
Strava a stelivo	Doporučuje se nízká úroveň fytoestrogenů ve stravě a stelivu	
	Postup	
Metoda	Metoda s nezralými zvířaty bez odstranění vaječníků (upřednostňovaná metoda) Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky	Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky
Věk podávání dávek u nezralých zvířat	Nejdříve v 18. postnatální den. Podávání by mělo být ukončeno před 25. postnatálním dnem.	V rámci stávající zkušební metody není relevantní.
Věk odstranění vaječníků	6. až 8. týden věku.	
Věk podávání dávek u zvířat s odstraněnými vaječníky	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 14 dnů.	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 7 dnů.
Tělesná hmotnost	Rozdíly v tělesné hmotnosti by měly být minimální a od střední hmotnosti by se měly lišit nejvýše o ± 20 %.	

▼M5

	Potkani	Myši
Dávkování		
Způsob podání	Orální sondou nebo subkutánní injekcí.	
Četnost podávání	Jedna denní dávka	
Objem látky pro sondu nebo injekci	≤ 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti (nebo až 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti v případě vodného roztoku) (ve 2 injekcích při subkutánním způsobu)	
Trvání podávání	3 po sobě jdoucí dny u modelu s nezralými Nejméně 3 po sobě jdoucí dny u modelu s odstraněnými vaječníky	7 po sobě jdoucích dnů u modelu s odstraněnými vaječníky
Doba pitvy	Přibližně 24 hodin po poslední dávce	
Výsledky		
Pozitivní reakce	Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy (ve vlhkém a/nebo ve vysušeném stavu)	
Referenční estrogen	17-alfa-ethinylestradiol	

POKYNY PRO INTERPRETACI A PLATNOST VÝSLEDKŮ

54. Obecně by zkouška estrogenity měla být považována za pozitivní, jestliže existuje statisticky významné zvýšení hmotnosti dělohy ($p < 0,05$) přinejmenším při vysoké úrovni dávky v porovnání s kontrolní skupinou vystavenou pouze působení rozpouštědla. Pozitivní výsledek je dále podpořen prokázáním biologicky přijatelného vztahu mezi dávkou a velikostí odezvy s přihlédnutím k tomu, že tvar křivky dávka-odpověď může ovlivnit překrývající se estrogenní a antiestrogenní působení zkoušené chemické látky.

55. Musí se dbát na to, aby nebyla překročena maximální tolerovaná dávka, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a jakékoli další nálezy.

56. Důležitým faktorem pro přijetí údajů získaných při uterotrofní biologické zkoušce jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině s vehikulem. Vysoké kontrolní hodnoty mohou zpochybnit citlivost biologické zkoušky a schopnost odhalit velmi slabé agonisty estrogenu. Literární rešerše a údaje získané při validaci uterotrofní biologické zkoušky naznačují, že k případům vysokých kontrolních hodnot dochází spontánně, zejména u nezralých zvířat (2)(3)(6)(9). Jelikož hmotnost dělohy nezralých potkanů závisí na mnoha proměnných, jako je kmen nebo tělesná hmotnost, nelze pro hmotnost dělohy s konečnou platností stanovit žádnou horní hranici. Jako určité vodítko může posloužit, že pokud jsou hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u nezralých potkanů v kontrolní skupině v rozmezí 40 až 45 mg, měly by být výsledky považovány za podezřelé, a hmotnosti dělohy vyšší než 45 mg mohou vést k provedení nové zkoušky. Toto však musí být zváženo v každém jednotlivém případě (3)(6)(8). Při zkouškách s dospělými potkany neúplné odstranění vaječníků ponechá vaječníkovou tkáň, která může produkovat endogenní estrogen a brzdit návrat hmotnosti dělohy do původního stavu.

▼M5

57. Hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u zvířat z kontrolní skupiny s vehikulem, které jsou nižší než 0,09 % tělesné hmotnosti pro nezralé samice potkana a nižší než 0,04 % tělesné hmotnosti pro mladé dospělé samice s odstraněnými vaječníky, podle všeho znamenají přijatelné výsledky [viz tabulka 31 (2)]. Jestliže jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině vyšší než tyto hodnoty, měly by být přezkoumány různé faktory včetně věku zvířat, řádného odstranění vaječníků, obsahu fytoestrogenů ve stravě atd. a negativní výsledky zkoušky (žádné příznaky estrogenní aktivity) by měly být používány s obezřetností.

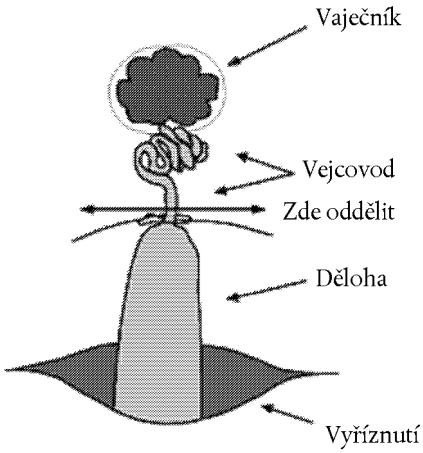
58. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční estrogeny, jako je 17-alfa-ethinylestradiol. Laboratoře též mohou zkoušet reakce na známé slabé agonisty estrogenů. Všechny tyto údaje je možné porovnat s dostupnými údaji (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), aby bylo zaručeno, že metody používané laboratoří zajišťují dostatečnou citlivost.

59. Hmotnosti děloh ve vysušeném stavu v průběhu validační studie OECD vykazovaly menší variabilitu než hmotnosti děloh ve vlhkém stavu (6)(7). Výrazná reakce při kterémkoli měření by však ukazovala na to, že zkoušená chemická látka je z hlediska estrogenního působení pozitivní.

60. Uterotrofní reakce není zcela estrogenního původu, avšak pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky by obecně měl být interpretován jako důkaz estrogenního potenciálu *in vivo* a měl by normálně vyvolat kroky směřující k dalšímu vyjasnění (viz odstavec 9 a „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“, příloha 2).

Obrázek 1

Schematický diagram ukazující chirurgické odstranění vaječníků



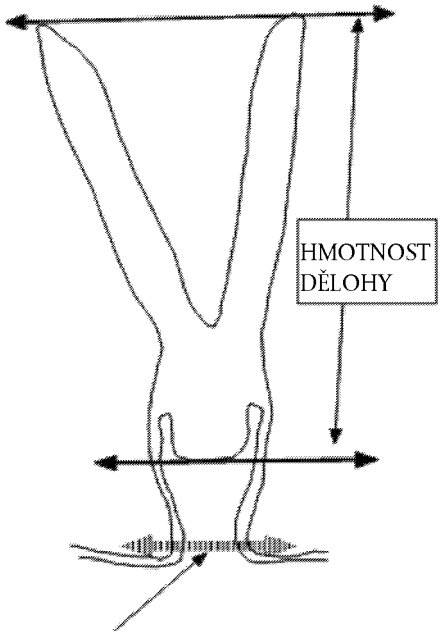
Mesometrium, vaskulatura a tukový polštář nejsou znázorněny

Postup začíná otevřením dorzo-laterální stěny břišní ve středním bodě mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní, několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Uvnitř břišní dutiny by měly být umístěny vaječníky. Na aseptickém poli se vaječníky poté fyzicky oddělí od břišní dutiny, mezi vaječník a dělohu se umístí podvaz za účelem kontroly krvácení a vaječník se nad podvazem oddělí řezem ve spojení vejcovodu s každým děložním rohem. Po ujištění, že nepřetrvává žádné výrazné krvácení, se břišní stěna uzavře suturou a kůže se uzavře např. klipy nebo suturou. Zvířatům by mělo být umožněno zotavení a návrat hmotnosti dělohy do původního stavu po dobu nejméně 14 dnů před použitím.

▼**M5**

Obrázek 2

Odstranění a zpracování děložních tkání pro měření hmotnosti



Postup začíná otevřením břišní stěny ve srůstu stydké kosti. Poté se od dorzální břišní stěny oddělí každý z vaječníků, jsou-li přítomny, a roh dělohy. Od ventrální a laterální strany dělohy a vaginy se oddělí močový měchýř a močovody. Odděluje se fibrózní adheze mezi rektem a vaginou, dokud nelze identifikovat spojení poševního vchodu s perineální kůží. Děloha a vagina se oddělí od těla naříznutím poševní stěny těsně nad spojením mezi perineální kůží, jak je ukázáno na obrázku. Děloha by měla být oddělena od bočního svalstva jemným odříznutím děložního okruží v bodě jeho připojení po celé délce dorzálně laterálního aspektu každého děložního rohu. Po oddělení od těla se odstraní přebytečný tuk a spojovací tkáň. Jsou-li přítomny vaječníky, oddělí se ve vejcovodu, aby nedošlo ke ztrátě luminální tekutiny z děložního rohu. Pokud byly zvířeti vaječníky odstraněny, měly by se vyšetřit pahýly, zda nejsou přítomny tkáně vaječníků. Vagina se oddělí od dělohy těsně pod děložním hrdlem, takže hrdlo zůstane s tělem dělohy, jak je ukázáno na obrázku. Poté lze dělohu zvážit.

▼M5

Dodatek 1

DEFINICE

Antiestrogenita: je schopnost chemické látky potlačit působení 17-beta-estradiolu v organismu savců.

Citlivost: je podíl všech pozitivních/účinných chemických látek, které jsou správně klasifikovány zkouškou. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Datum narození: je 0. postnatální den.

Dávkování: je obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

Dávka: je množství podané zkoušené chemické látky. U uterotrofní biologické zkoušky je dávka vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zkušebního zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den).

Estrogenita: je schopnost chemické látky působit jako 17-beta-estradiol v organismu savců.

Chemická látka: znamená látku nebo směs.

Maximální tolerovaná dávka (MTD): je nejvyšší množství chemické látky, které, je-li zavedeno do těla, zkušební zvířata neusmrtí (označuje se jako LD_0) (IUPAC, 1993).

Specifičnost: je podíl všech negativních/neúčinných chemických látek, které jsou správně zkouškou klasifikovány. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává jednoznačné výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Uterotrofní: je termín používaný k popisu pozitivního vlivu na růst děložních tkání.

Validace: je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevanci pro určitý konkrétní cíl.

X. postnatální den: je x-tý den života po dni narození.

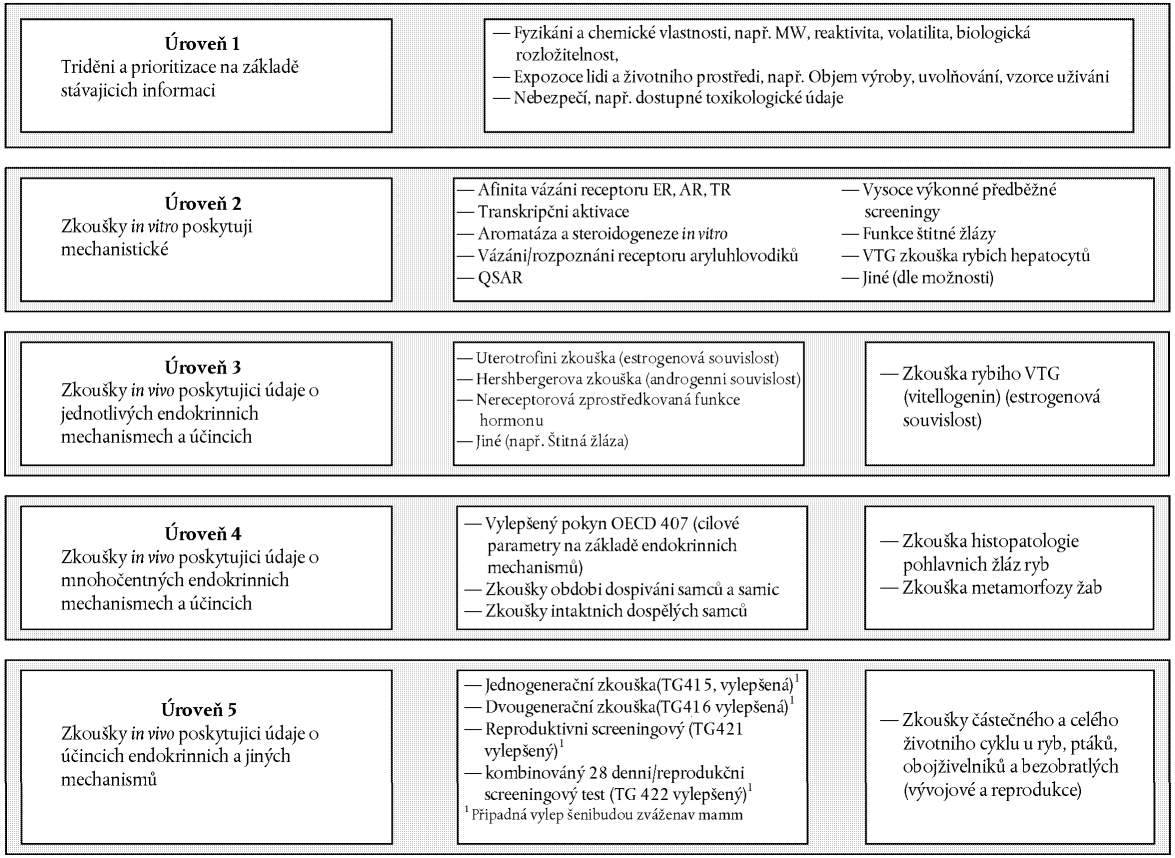
Zkoušená chemická látka: znamená jakoukoli látku nebo směs zkoušenou touto zkušební metodou.

▼M5

Dodatek 2

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebnich pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedáni pracovni skupiny EDTA

OECD Koncepčni rámec pro zkoušky a hodnoceni endokrinnich distruptorů



VMG mamm: Skupina pro řízení validace zkoušek prováděných na savcích

▼**M5**

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

Poznámka 1: Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.

Poznámka 3: Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.

Poznámka 4: Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.

Poznámka 5: Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímně. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.

Poznámka 6: U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

▼M5

LITERATURA

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3) Owens, J.W., Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32, 445–520.

4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

5) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., Owens, W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109, 785–94.

6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111, 1530–1549.

8) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111, 1550–1558.

9) Owens, W., Ashby, J., Odum, J., Onyon, L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111, 1559–1567.

10) Ogasawara, Y., Okamoto, S., Kitamura, Y., Matsumoto, K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology113, 582–587.

11) Branham, W.S., Sheehan, D.M., Zehr, D.R., Ridlon, E., Nelson, C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology117, 2229–2237.

12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerkel, K., Lichtensteiger, W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127, 10–15.

13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., Shoger, R.L. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science, 118, 650–651.

14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Saba, N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. *Cosmet. Toxicol.* 13, 425–427.

15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., Makela, S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106, 369–373.

▼**M5**

16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67.

17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M.. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128, 145–157.

18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., Curran, I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41, 1517–1525.

19) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Wada, T., Hara, T., Takatsuki, M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76, 613–620.

20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., Forsythe, D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53, 477–485.

21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., Boyle, C.C. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20, 343–347.

22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Haseman, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., Forsythe, D.B. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26, 381–393.

23) Thigpen, J.E., Li, L-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., Jameson, C.W. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37, 596–601.

24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 425, Paris.

25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85, 320–333.

28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19, 33–41.

29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34, 288–305.

30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24, 284–291.

31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

32) Dorfman, R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33) Thigpen, J.E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4), 401–416.

▼**M5**

34) Gray, L.E. and Ostby, J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14(1–2), 159–184.

35) Booth, A.N., Bickoff, E.M. and Kohler, G.O. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science, 131, 1807–1808.

36) Kato, H., Iwata, T., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., Iguchi, T. (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

38) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

▼M5

B.55. HERSHBERGEROVA BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA POTKANECH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ANDROGENNÍCH/ANTIANDROGENNÍCH VLASTNOSTÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 441 (2009). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat zkušební zásady pro provádění Hershbergerovy biologické zkoušky na potkanech. Po několika desetiletích využívání ve farmaceutickém odvětví byla tato zkouška poprvé standardizována oficiálním expertním výborem v roce 1962 jakožto nástroj pro zjišťování androgenních chemických látek (2). V letech 2001–2007 prošla Hershbergerova biologická zkouška na potkanech rozsáhlým validačním programem, jehož součástí mimo jiné bylo vytvoření Základního hodnotícího dokumentu (23), sestavení podrobného metodického listu (3), vypracování návodu pro pitvu (21) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií za účelem prokázání spolehlivosti a reprodukovatelnosti této biologické zkoušky. Tyto validační studie byly provedeny s účinným referenčním androgenem (testosteron propionát (TP)), dvěma účinnými syntetickými androgeny (trenbolon acetát a methyltestosteron), účinnou antiandrogenní farmaceutickou látkou (flutamid), účinným inhibitorem syntézy (finasterid) přírodního androgenu (dihydrotestosteron (DHT)), několika slabými antiandrogenními pesticidy (linuron, vinklozolin, procymidon, p,p'-DDE), účinným inhibitorem 5-alfa-reduktázy (finasterid) a dvěma známými negativními chemickými látkami (dinitrofenol a nonylfenol) (4)(5)(6)(7)(8). Tato zkušební metoda je výsledkem dlouholetých historických zkušeností s touto biologickou zkouškou a zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z jejich výsledků.

2. Hershbergerova biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška *in vivo* s použitím přídatných tkání samčího reprodukčního traktu. Zkouška vznikla ve 30. letech 20. století a byla ve 40. letech pozměněna tak, aby zahrnovala svaly v samčím reprodukčním traktu reagující na androgeny (2) (9–15). V 60. letech bylo pomoci standardizované verze protokolu hodnoceno více než 700 možných androgenů (2)(14) a použití této zkoušky bylo v 60. letech považováno za standardní metodu zjišťování androgenních i antiandrogenních látek (2)(15). Stávající biologická zkouška je založena na změnách v hmotnosti pěti tkání závislých na androgenech u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Hodnotí schopnost chemické látky vyvolat biologické aktivity odpovídající agonistům a antagonistům androgenů a inhibitorům 5-alfa-reduktázy. Pět cílových tkání závislých na androgenech, které jsou zahrnuty do této zkušební metody, jsou ventrální prostata (VP), semenný váček (SV) (spolu s tekutinami a koagulačními žlázami), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), pár Cowperových žláz (COW) a žalud penisu (GP). U kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období všech těchto pět tkání reaguje na androgeny růstem absolutní hmotnosti. Jsou-li tytéž tkáně podáváním účinného referenčního androgenu stimulovány k nárůstu hmotnosti, na antiandrogeny všech těchto pět tkání reaguje snížením absolutní hmotnosti. Primárním modelem pro Hershbergerovu biologickou zkoušku byl chirurgicky kastrovaný samec v peripubertálním období, což bylo validováno ve fázi 1, 2 a 3 programu validace Hershbergerovy zkoušky.

3. Hershbergerova biologická zkouška slouží jako mechanistická screeningová zkouška ke zjišťování agonistů androgenů, antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo* a její provedení je nutno posuzovat v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (dodatek 2). V tomto koncepčním rámci je Hershbergerova biologická zkouška zařazena na

▼M5

úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jednom endokrinním mechanismu, tj. androgenitě/antiandrogenitě. Předpokládá se její zařazení do série zkoušek *in vitro* a *in vivo*, jejichž účelem je zjišťování chemických látek schopných interakce s endokrinním systémem a které v konečném důsledku vedou k posouzení nebezpečí a rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí.

4. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty byl v souvislosti s kastrací pro Hershbergerovu biologickou zkoušku hledán alternativní model s využitím intaktních (nekastrovaných) stimulovaných odstavených mláďat, aby bylo možno se vyhnout kroku kastrace. Zkušební metoda se stimulovanými odstavenými mláďaty byla podrobena validaci (24); při validačních studiích se však ukázalo, že verze Hershbergerovy biologické zkoušky s odstavenými mláďaty nebyla schopna při zkoušených dávkách stabilně detekovat účinky slabých antiandrogenů na hmotnost orgánů závislých na androgenech. Proto nebyla do této zkušební metody zařazena. Uznává se však, že její použití může být prospěšné nejen z hlediska dobrého zacházení se zvířaty, ale může také poskytnout informace o jiných způsobech působení a je k dispozici v Pokynech OECD č. 115 (25).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Agonisté a antagonisté androgenů působí jako ligandy na receptor androgenu a mohou aktivovat (agonisté) nebo potlačovat (antagonisté) transkripci genů, kterou tento receptor kontroluje. Některé chemické látky kromě toho potlačují přeměnu testosteronu na více účinný přirozený androgen, dihydrotestosteron, v některých androgenních cílových tkáních (inhibitory 5-alfa-reduktázy). Působení takových chemických látek může vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje regulační potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty androgenů nebo inhibitoru 5-alfa-reduktázy. Afinita ligandu k androgennímu receptoru měřená vazbou na receptor nebo aktivací transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, není jediným určujícím faktorem možného nebezpečí. Jinými určujícími faktory jsou např. aktivace a deaktivace metabolismu po vstupu do organismu, distribuce chemické látky do cílových tkání a vymizení z těla. Proto je potřeba zjišťovat možné aktivity chemické látky *in vivo* za příslušných podmínek a expozice. Hodnocení *in vivo* má méně zásadní význam, jsou-li známy typické znaky absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME) dané chemické látky. Tkáně závislé na androgenech reagují na stimulaci androgeny rychlým a mohutným růstem, zejména u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Druhy hlodavců, zejména potkan, jsou široce používány také ve studiích toxicity pro charakterizaci nebezpečnosti chemických látek. Proto je verze zkoušky používající kastrované potkany v peripubertálním věku a pět cílových tkání vhodná pro zjišťování agonistů a antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo*.

6. Tato zkušební metoda je založena na těch zkušebních postupech použitých při validační studii OECD, u kterých byla při vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studiích prokázána jejich spolehlivost a reprodukovatelnost. V této zkušební metodě jsou prezentovány jak androgenní, tak antiandrogenní postupy.

7. V dávce TP použité jednotlivými laboratořemi v rámci programu OECD pro validaci Hershbergerovy biologické zkoušky se vyskytla určitá odchylka (0,2 mg oproti 0,4 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den, při podávání subkutánní injekcí), avšak obě tyto varianty protokolu se jen málo lišily ve schopnosti detekovat slabou či silnou antiandrogenní aktivitu. Je však jasné, že dávka TP by neměla být příliš vysoká, aby neblokovala účinek slabých antagonistů androgenového receptoru, ani tak nízká, aby androgenní tkáně i bez spolupodávání antiandrogenů vykazovaly slabou růstovou reakci.

▼M5

8. Růstová reakce jednotlivých tkání závislých na androgenech není zcela androgenního původu, tj. hmotnost určitých tkání mohou změnit i jiné chemické látky než agonisté androgenů. Avšak růstová reakce některých tkání je doprovodným jevem specifičtějšího působení androgenního mechanismu. Například vysoké dávky účinných estrogenů mohou zvýšit hmotnost semenných váčků; jiné tkáně závislé na androgenech však při studii podobným způsobem nereagovaly. Antiandrogenní chemické látky mohou působit buď jako antagonistní látky androgenních receptorů, nebo jako inhibitory 5-alfa-reduktázy. Inhibitory 5-alfa-reduktázy mají variabilní účinek, protože přeměna na více účinný dihydrotestosteron se liší podle jednotlivých tkání. Antiandrogeny potlačující 5-alfa-reduktázu, např. finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně, na rozdíl od účinného antagonisty androgenního receptoru, jako je flutamid. Tato rozdílná reakce tkání může být využita pro rozlišení mezi způsoby působení zprostředkovanými androgenním receptorem a působení zprostředkovaného 5-alfa-reduktázou. Androgenní receptor kromě toho vývojově souvisí s receptory jiných steroidních hormonů a některých dalších hormonů, které, jsou-li podávány na vysokých, suprafyziologických úrovních dávkování, mohou vázat a antagonizovat účinky TP podporující růst. Dále je také reálné, že zesílený steroidní metabolismus a následné snížení testosteronu v séru by mohly růst tkání závislých na androgenech oslabit. Jakýkoli pozitivní výsledek Hershbergerovy biologické zkoušky by proto měl být normálně hodnocen metodou posuzování závažnosti všech dostupných údajů, včetně zkoušek *in vitro*, jako jsou zkoušky vazby receptorů androgenů a receptorů estrogenů a zkoušky odpovídající transkripční aktivace, nebo údajů z jiných zkoušek *in vivo*, které zkoumají podobné androgenní cílové tkáně, jako jsou zkoušky na samcích v pubertálním věku, 15denní studie na intaktních dospělých samcích nebo 28denní či 90denní studie s opakovanými dávkami.

9. Zkušenosti ukazují, že xenobiotické androgeny jsou vzácnější než xenobiotické antiandrogeny. Předpokládá se tedy, že Hershbergerova biologická zkouška se bude nejčastěji používat pro zjišťování antiandrogenů. Nicméně postup pro zkoušení androgenů by se měl používat u steroidů nebo steroidům podobných chemických látek nebo u chemických látek, kde byly známky možných androgenních účinků zjištěny metodami uvedenými uvedených na úrovni 1 nebo 2 koncepčního rámce (dodatek 2). Podobně mohou být nepříznivé účinky spojené s androgenními/antiandrogenními profily pozorovány při zkouškách na úrovni 5, což by mělo vést k posouzení, zda určitá chemická látka působí endokrinně.

10. Uznává se, že veškeré postupy založené na zvířatech by měly splňovat místní normy v oblasti péče o zvířata; popisy péče a zacházení, které jsou stanoveny níže, jsou minimální výkonnostní normy a budou nahrazeny místními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (17).

11. Jako při každé biologické zkoušce, při které jsou použita zkušební zvířata, by se mělo pečlivě zvážit, zda je nezbytné tuto studii provádět. Pro takové rozhodnutí mohou být v zásadě dva důvody:

— vysoká možnost expozice (úroveň 1 koncepčního rámce) nebo příznaky androgenity/antiandrogenity zjištěné při zkouškách *in vitro* (úroveň 2), kdy by se následně mělo zjistit, zda takové účinky mohou nastat *in vivo*,

— účinky odpovídající androgenitě/antiandrogenitě zjištěné při zkouškách *in vivo* na úrovni 4 nebo 5, kdy by se měl dále zkoumat specifický způsob účinku, to jest stanovit, zda účinky byly vyvolány androgenním/antiandrogenním mechanismem.

▼M5

12. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

13. Hershbergerova biologická zkouška dosahuje své citlivosti díky použití samců s minimální endogenní produkcí androgenů. Toho je dosaženo použitím kastrovaných samců za předpokladu, že po kastraci se poskytne dostatek času, aby se cílové tkáně mohly vrátit k minimální a jednotné výchozí hmotnosti. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity tak existují nízké endogenní úrovně cirkulujících androgenů, hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa není schopna prostřednictvím mechanismů zpětné vazby zajistit kompenzaci, maximalizuje se reaktivní schopnost tkání a minimalizuje se variabilita výchozích hmotností tkání. Při zjišťování potenciální antiandrogenní aktivity lze dosáhnout stabilnějšího přírůstku hmotnosti tkání, jsou-li tkáně stimulovány referenčním androgenem. Vzhledem k uvedeným skutečnostem Hershbergerova biologická zkouška vyžaduje pouze 6 zvířat v každé exponované skupině, zatímco při jiných zkouškách s intaktními pubertálními nebo dospělými samci se doporučuje použít 15 samců v každé exponované skupině.

14. Kastrace samců potkanů v peripubertálním období by měla být provedena vhodným způsobem, s použitím schválených anestetik a aseptickou technikou. Několik prvních dnů po operaci by měla být podávána analgetika s cílem eliminovat pooperační utrpení. Pokud jde detekci slabých androgenů a antiandrogenů, kastrace zvyšuje přesnost zkoušky tím, že vyřazuje kompenzační mechanismy endokrinní zpětné vazby přítomné u intaktního zvířete, které mohou účinky podávaných androgenů a antiandrogenů oslabit, a odstraňuje značné rozdíly v úrovni testosteronu v séru jednotlivých zvířat. Kastrace tedy snižuje počet zvířat požadovaný pro zjištění těchto endokrinních aktivit.

15. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity se zkoušená chemická látka podává denně orální sondou nebo subkutánní injekcí po dobu deseti po sobě jdoucích dnů. Zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálním skupinám zkušebních zvířat, přičemž každé skupině je aplikována jiná úroveň dávky. Přibližně po 24 hodinách od poslední dávky se zvířata podrobí pitvě. Statisticky významný nárůst hmotnosti dvou nebo více cílových orgánů ve skupinách, jimž byla podávána zkoušená chemická látka, v porovnání s kontrolní skupinou s vehikulem ukazuje, že zkoušená chemická látka je z hlediska potenciální androgenní aktivity pozitivní (viz odstavec 60). Androgeny, jako například trenbolon, které nemohou být redukovány 5-alfa-reduktázou, mají výraznější účinek na LABC a GP, než má TP, avšak zvýšený růst by měly vykázat všechny tkáně.

16. Při zjišťování potenciální antiandrogenní aktivity se zkoušená chemická látka podává denně orální sondou nebo subkutánní injekcí po dobu deseti po sobě jdoucích dnů souběžně s denními dávkami TP (0,2 mg nebo 0,4 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den) aplikovanými subkutánní injekcí. Při validačním programu bylo stanoveno, že mohou být použity dávky TP buď 0,2 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den, nebo 0,4 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den, neboť při detekci antiandrogenů byly účinné obě tyto hodnoty, a pro použití při zkoušce by proto měla být vybrána pouze jedna z těchto dávek. Odstupňované dávky zkoušené chemické látky se podávají nejméně třem experimentálním skupinám pokusných zvířat, přičemž každé skupině je aplikována jiná úroveň dávky. Přibližně po 24 hodinách od poslední dávky se zvířata podrobí pitvě. Statisticky významný pokles hmotností dvou nebo více cílových orgánů ve skupinách, jimž byla podávána zkoušená chemická látka spolu s TP, v porovnání s kontrolní skupinou, které byl podáván pouze TP, ukazuje, že zkoušená chemická látka je z hlediska potenciální antiandrogenní aktivity pozitivní (viz odstavec 61).

▼M5

POPIS METODY

Výběr druhu a kmene

17. Od 30. let 20. století je při Hershbergerově biologické zkoušce běžně používán potkan. Ačkoli je z biologického hlediska možné, že potkan i myš by vykázaly podobné reakce, je na základě 70letých zkušeností s modelem potkanů pro Hershbergerovu biologickou zkoušku upřednostňovaným druhem potkan. Navíc, jelikož údaje získané při Hershbergerově biologické zkoušce mohou být předběžnými údaji pro dlouhodobou vícegenerační studii, je možné použít při obou studiích zvířata stejného druhu, kmene a původu.

18. Tento zkušební postup umožňuje, aby si laboratoř pro použití v této zkoušce vybrala kmen potkanů, který by obecně měl být stejný jako kmen historicky používaný v této laboratoři. Použity mohou být běžně používané kmeny laboratorních potkanů; neměly by však být použity kmeny, které pohlavně dozrávají výrazně později než ve věku 42 dnů, jelikož kastrace těchto samců ve věku 42 dnů věku by mohla znemožnit měření hmotnosti žaludu penisu, které může být provedeno teprve po odpojení předkožky od těla penisu. Neměly by tedy, až na vzácné případy, být použity kmeny odvozené od potkanů Fisher 344. Potkani Fisher 344 mají jiný časový průběh pohlavního vývoje než jiné, běžněji používané kmeny, např. kmeny Sprague Dawley nebo Wistar (16). Má-li být takový kmen použit, měla by laboratoř tato zvířata kastrovat v poněkud pozdějším věku a měla by být schopna prokázat citlivost použitého kmene. Výběr kmene potkanů by laboratoř měla jasně zdůvodnit. Tam, kde screeningová zkouška může být předběžnou studií pro studii s opakovaným podáváním dávky orální cestou, pro reprodukční a vývojovou studii nebo pro dlouhodobou studii, měla by být ve všech studiích přednostně používána zvířata stejného kmene a původu.

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat všem místním normám péče o laboratorní zvířata. Tyto popisy péče a zacházení jsou minimálními normami a budou nahrazeny přísnějšími místními nařízeními, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem musí být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

20. Skupinový chov se upřednostňuje před izolací vzhledem k mladému věku zvířat a ke skutečnosti, že potkani jsou společenská zvířata. Chov po dvou nebo třech zvířatech v každé kleci zamezí stísněným podmínkám a s nimi spojenému stresu, který může ovlivnit hormonální kontrolu vývoje přídatné tkáně pohlavních orgánů. Klece by měly být pečlivě čištěny, aby se odstranily možné kontaminující látky, a uspořádány tak, aby byl možný vliv umístění klecí minimalizován. Klece náležité velikosti (~ 2 000 cm^2) zabrání stísněným podmínkám.

21. Každé zvíře musí být jednotlivě označeno (např. ušní známkou nebo štítkem) humánním způsobem. Metoda označení se zaznamená.

▼M5

22. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata v libovolném množství. Laboratoře provádějící Hershbergerovu biologickou zkoušku by měly používat laboratorní stravu, kterou běžně používají při své práci zkoušení chemických látek. Při validačních studiích pro tuto biologickou zkoušku nebyly pozorovány žádné účinky nebo variabilita, které by bylo možné přičíst stravě. Použitá strava se zaznamená a vzorek laboratorní stravy se uchová pro případnou budoucí analýzu.

Kritéria hmotnosti orgánů závislých na androgenech

23. Během validační studie nebyly získány žádné poznatky, že by pokles tělesné hmotnosti ovlivnil zvýšení nebo snížení růstu hmotnosti cílových tkání (tj. těch, které by se při této studii měly vážit).

24. Z jednotlivých kmenů potkanů, které byly úspěšně použity v rámci validačního programu, vykazují těžší kmeny potkanů vyšší hmotnosti orgánů závislých na androgenech než lehčí kmeny. Proto kritéria pro Hershbergerovu biologickou zkoušku neobsahují absolutní očekávané hmotnosti orgánů pro pozitivní a negativní kontrolní skupiny.

25. Vzhledem k existenci vztahu nepřímé úměry mezi variačním koeficientem (CV) pro určitou tkáň a statistickou váhou údajů, jsou kritéria Hershbergerovy biologické zkoušky založena na maximálních hodnotách variačního koeficientu pro každou tkáň (Tabulka 1). Variační koeficienty jsou odvozeny z validačních studií OECD. V případě negativních výsledků by laboratoře měly zkoumat variační koeficienty z kontrolní skupiny a z experimentální skupiny, které byly podávány vysoké dávky, a stanovit, zda nebyla překročena kritéria pro maximální variační koeficient.

26. Studie my měla být zopakována, pokud: 1) tři nebo více z deseti možných variačních koeficientů u jednotlivých zvířat v kontrolní skupině a ve skupině, které byly podávány vysoké dávky, překročí maximum stanovené pro studie agonistů a antagonistů uvedené v tabulce 1 a 2) nejméně dvě cílové tkáně byly marginálně insignifikantní, tj. hodnoty ρ byly mezi 0,05 a 0,10.

Tabulka 1

Maximální přípustné variační koeficienty stanovené pro cílové přídatné pohlavní tkáně u modelu kastrovaných zvířat při validačních studiích OECD ([1])

Tkáň	Antiandrogenní účinky	Androgenní účinky
Semenné váčky	40 %	40 %
Ventrální prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperovy žlázy	35 %	55 %
Žalud penisu	17 %	22 %

([1]) Prahový variační koeficient pro danou tkáň byl zjištěn z grafu hodnot variačního koeficientu – uspořádaných od nejmenších postupně až po nejvyšší – u všech průměrů ze všech experimentů v rámci validační studie pomocí specifického modelu (agonistní nebo antagonistní). Prahový variační koeficient byl vzat z bodu, od kterého přírůstky mezi nejbližšími nejvyššími variačními koeficienty v řadě jsou dramaticky vyšší než několik předchozích variačních koeficientů – „bodu zlomu“. Je třeba poznamenat, že tato analýza určila poměrně spolehlivé „body zlomu“ u antagonistního modelu zkoušky, ale křivky variačních koeficientů u zkoušky agonistů vykázaly pozvolnější růst, což činí určení prahového koeficientu touto metodou poněkud subjektivním.

▼M5

POSTUP

Dodržování právních předpisů a laboratorní ověření

27. Na rozdíl od uterotrofní zkoušky (kapitola B.54 této přílohy) není při Hershbergerově biologické zkoušce nutné před zahájením studie prokazovat způsobilost laboratoře, protože nedílnou součástí zkoušky je souběžné provádění pozitivní (testosteron propionát a flutamid) a negativní kontroly.

Počet a stav zvířat

28. Každá experimentální i kontrolní skupina by měla zahrnovat nejméně 6 zvířat. To platí pro androgenní i pro antiandrogenní protokol.

Kastrace

29. Po příjmu zvířat by mělo proběhnout počáteční aklimatizační období v trvání několika dní, aby se zajistilo, že zvířata jsou zdravá a prosperující. Jelikož zvířata kastrovaná před 42. dnem života nebo 42. postnatálním dnem nemusí mít oddělenou předkožku, měla by být kastrována v 42. postnatální den nebo později, ne však dříve. Kastrace zvířat se provádí v anestezii provedením řezu v šourku a odstraněním obou varlat a nadvarlat s podvázáním cév a chámovodů. Po ujištění, že nedochází ke krvácení, se šourek uzavře suturou nebo klipsy. Po několik dnů po operaci by zvířatům měla být podávána analgetika ke zmírnění pooperačního utrpení. Jsou-li od dodavatele zvířat nakupována kastrovaná zvířata, dodavatel by měl potvrdit jejich věk a stadium pohlavní zralosti.

Aklimatizace po kastraci

30. Po kastraci by zvířatům měla být poskytnuta další aklimatizace na laboratorní podmínky v trvání nejméně 7 dnů s cílem umožnit návrat hmotností cílových tkání do původního stavu. Zvířata by měla být denně pozorována a všechna zvířata s příznaky nemoci nebo fyzických abnormalit se odstraní. Expozice s podáváním dávek (v rámci studie) tak může začít již v 49. postnatální den, avšak nejpozději v 60. postnatální den. Věk při pitvě by neměl být vyšší než 70. postnatální den. Tato pružnost umožňuje laboratoři efektivně naplánovat experimentální práci.

Tělesná hmotnost a náhodný výběr do skupin

31. Rozdíly v tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat jsou zdrojem variability v hmotnosti tkání v rámci skupin zvířat i mezi těmito skupinami. Rostoucí variabilita v hmotnosti tkání vede k vyššímu variačnímu koeficientu (CV) a snižuje statistickou váhu zkoušky (někdy označovanou jako citlivost zkoušky). Variace tělesné hmotnosti by proto měly být experimentálně i statisticky kontrolovány.

32. Experimentální kontrola zahrnuje dosažení malých variací tělesné hmotnosti v rámci studijních skupin a mezi těmito skupinami. Zaprvé, neobvykle malá nebo neobvykle velká zvířata by měla být vyloučena a neměla by být umísťována do studijní kohorty. Při zahájení studie by variace hmotnosti použitých zvířat neměla převyšovat ± 20 % střední hodnoty hmotnosti (např. 175 g ± 35 g pro kastrované potkany v peripubertálním věku). Zadruhé, zvířata by měla být přiřazena do skupin (kontrolní a experimentální) náhodnou hmotnostní distribucí, takže střední hodnota tělesné hmotnosti každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Použitý postup blokové randomizace je třeba zaznamenat.

▼M5

33. Jelikož toxicita může snížit tělesnou hmotnost exponovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou, mohla by jako statistický kovariát být použita tělesná hmotnost v první den podávání zkoušené chemické látky, a nikoli tělesná hmotnost při pitvě.

Dávkování

34. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít androgenní účinek *in vivo*, běžně postačují dvě skupiny exponované zkoušené chemické látce a dále pozitivní kontrolní skupina a negativní kontrolní skupina s vehikulem (viz odstavec 43), S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je upřednostňováno uvedené uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-reakce nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně 3 exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjišťování androgenní aktivity (např. odhad potence), měly by být zváženy odlišné režimy dávkování. Při zkoušce na antiandrogeny se zkoušená chemická látka podává spolu s referenčním agonistou androgenů. Měly by být použity nejméně 3 zkušební skupiny s různými dávkami zkoušené chemické látky a pozitivní a negativní kontrolní skupina (viz odstavec 44). S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, měla by kontrolní skupina dostávat vehikulum v nejvyšším objemu, jaký je použit ve zkušebních skupinách.

35. Při navrhování a výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla zaprvé zohlednit LD_{50} a/nebo informace o akutní toxicitě, aby se předešlo úmrtím, bolestivému strádání nebo utrpení zvířat (17)(18)(19)(20), a za druhé by měla zohlednit dostupné informace o dávkách použitých v subchronických a chronických studiích. Obecně by nejvyšší dávka neměla vyvolat snížení konečné tělesné hmotnosti zvířat o více než 10 % v porovnání s hmotností kontrolní skupiny. Nejvyšší dávka by měla být buď 1) nejvyšší dávka, která zaručuje přežití zvířat a která nezpůsobuje významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí 10 po sobě jdoucích dnů od podávání, až po maximální dávku 1 000 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den (viz odstavec 36), nebo 2) dávka vyvolávající androgenní/antiandrogenní účinky podle toho, která dávka je nižší. V rámci screeningu jsou přijatelné velké intervaly v dávkování, např. po 0,5 log (což odpovídá odstupňování dávky v intervalech po 3,2) nebo dokonce v jednotkách logaritmické škály. Nejsou-li žádné vhodné údaje dostupné, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozmezí dávek (viz odstavec 37), aby se podle ní stanovily dávky, které mají být použity ve vlastní studii.

Limitní dávka

36. Jestliže zkouška při limitní dávce 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den nebo nižší dávce s použitím postupů předepsaných pro tuto studii nepovede ke statisticky významné změně v hmotnostech reprodukčních orgánů, pak mohou být další úrovně dávek považovány za zbytečné. Limitní dávka se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Důvody pro zjištění rozmezí dávek

37. V případě nutnosti může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek na několika zvířatech s cílem zvolit vhodné exponované skupiny [pomocí metod pro zkoušení akutní toxicity (kapitola B.1.a, B.1.b této přílohy (27), OECD TG 425 (19)). V případě Hershbergerovy biologické zkoušky je cílem vybrat dávky, které zaručí přežití zvířat a nezpůsobí významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí deseti po

▼M5

sobě jdoucích dnů podávání chemické látky, až do limitní dávky 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den uvedené v odstavcích 35 a 36. V této souvislosti lze použít Pokyn OECD (17), který stanoví klinické příznaky toxicity nebo utrpení zvířat. Je-li to v rámci této předběžné studie po deseti dnech podávání proveditelné, lze přibližně po 24 hodinách od podání poslední dávky vyjmout cílové tkáně a zvážit je. Tyto údaje by pak mohly být podpůrně použity při výběru dávek pro hlavní studii.

Referenční chemické látky a vehikulum

38. Referenčním agonistou androgenů by měl být testosteron propionát (TP), č. CAS 57-82-5. Dávka referenčního TP může být 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti za den nebo 0,4 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Referenčním antagonistou androgenů by měl být flutamid (FT), č. CAS 1311-84-7. Dávka referenčního FT by měla být 3 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den a FT by měl být podáván spolu s dávkou referenčního TP.

39. Je-li to možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však mnohé androgenní ligandy nebo jejich metabolické prekursory mají tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/suspenze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit ve zkušebním vehikulu na konečnou pracovní koncentraci. Měly by být známy typické toxické znaky daného rozpouštědla a měly by být prověřeny na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stálou, lze jejímu rozpuštění napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být stanovena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden výchozí alikvotní podíl zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci a znehodnocení vzorků.

Podávání dávek

40. TP by měl být podáván subkutánní injekcí a FT by měl být podáván orální sondou.

41. Zkoušená chemická látka se podává orální sondou nebo subkutánní injekcí. Při výběru způsobu podávání musí být zohledněna zásada dobrého zacházení se zvířaty a fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky. Je-li dosaženo pozitivních výsledků pomocí injekce, před zahájením rozsáhlého, dlouhodobého zkoušení by měly být zohledněny také toxikologické aspekty, jako je relevantnost z hlediska způsobu expozice člověka dané chemické látce (např. orální sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), a existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při určitém způsobu podávání).

42. Dávky by měly být zvířatům podávány stejným způsobem a ve stejné časové posloupnosti po dobu deseti po sobě jdoucích dnů přibližně v 24hodinových intervalech. Úroveň dávek by měla být denně upravována na základě souběžně prováděných denních měření tělesné hmotnosti. Objem dávky a doba jejího podávání by v každém dni expozice měly být zaznamenány. Je zapotřebí dbát na to, aby nebyla překročena maximální dávka uvedená v odstavci 35, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a veškeré další nálezy. Při podávání orální sondou by

▼M5

měla být použita žaludeční sonda nebo vhodná intubační kanyla. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny v oblasti péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti. Při podávání subkutánní injekcí by dávky měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 0,5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Specifické postupy pro agonisty androgenů

43. Při zkoušce na agonisty androgenů je negativní kontrolní skupinou skupina s vehikulem a pozitivní kontrolní skupinou je skupina exponovaná TP. Biologická aktivita odpovídající agonistům androgenů je zkoušena podáváním zkoušené chemické látky experimentálním skupinám ve zvolených dávkách po dobu 10 po sobě jdoucích dnů. Hmotnosti pěti přídatných pohlavních tkání ze skupin, kterým byla podávána zkoušená chemická látka, se porovnávají se skupinou s vehikulem, zda existují statisticky významné přírůstky hmotnosti.

Specifické postupy pro antagonisty androgenů a inhibitory 5-alfa-reduktázy

44. Při zkoušce na antagonisty androgenů a inhibitory 5-alfa-reduktázy je negativní kontrolní skupinou skupina exponovaná TP a pozitivní kontrolní skupinou je skupina, které jsou společně podávány referenční dávky TP a FT. Biologická aktivita odpovídající antagonistům androgenů a inhibitorům 5-alfa-reduktázy je zkoušena podáváním referenční dávky TP a podáváním zkoušené chemické látky po dobu 10 po sobě jdoucích dnů. Hmotnosti pěti přídatných pohlavních tkání ze skupin, kterým byl podáván TP spolu se zkoušenou chemickou látkou, se porovnávají s referenční skupinou, které byl podáván pouze TP, zda existují statisticky významné poklesy hmotnosti.

POZOROVÁNÍ

Poznatky z klinického pozorování

45. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Mělo by se provádět každý den nejlépe ve stejnou dobu (doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Provede se prohlídka všech zvířat za účelem zjištění úmrtnosti, nemocnosti a obecných klinických příznaků, jako jsou změny chování, změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání).

46. Všechna zvířata nalezená uhynulá se odeberou a odstraní bez další analýzy údajů. V záznamu o studii by měla být uvedena veškerá uhynutí zvířat před pitvou, spolu se zjevnými příčinami uhynutí. Zvířata v agónii se humánně utratí. Zvířata v agónii a následně usmrcená se uvedou v záznamu o studii, spolu se zjevnými příčinami nemocnosti.

▼M5

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

47. Všechna zvířata by se měla denně zvážit s přesností na 0,1 g, přičemž první vážení by mělo být provedeno těsně před zahájením aplikace, tj. když jsou zvířata rozdělena do skupin. Alternativně lze změřit množství potravy spotřebované během doby aplikace na každou klec zvážením krmítek. Výsledky spotřeby potravy by měly být vyjádřeny v gramech na jednoho potkana za den.

Pitva a měření hmotnosti tkání a orgánů

48. Přibližně po 24 hodinách od posledního podání zkoušené chemické látky se potkani usmrtí, nechají vykrvácet v souladu s běžnými postupy provádějící laboratoře a provede se pitva. V závěrečné zprávě laboratoře by měla být uvedena metoda humánního usmrcení.

49. Ideálně by pořadí pitev mělo být určeno náhodným výběrem mezi skupinami, aby nedošlo k lineárnímu pořadí od nejméně exponované skupiny k nejvíce exponované skupině, či naopak, což by mohlo ovlivnit údaje. Veškeré pitevní nálezy, tj. patologické změny/viditelné léze by měly být zaznamenány a uvedeny ve zprávě.

50. Zváží se pět tkání závislých na androgenech (ventrální prostata (VP), semenné váčky (SV), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), Cowperovy žlázy (COW), žalud penisu GP)), Tyto tkáně se vyříznou, opatrně zbaví nadbytečných ulpělých tkání a tuku a stanoví se jejich hmotnost v čerstvém (nefixovaném) stavu. S každou tkání je nutno zacházet s obzvláštní pečlivostí, aby nedošlo ke ztrátě tekutin a aby nedošlo k vysychání, což může způsobit významné chyby a variabilitu v důsledku snížení zaznamenávaných hmotností. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Je proto důležité, aby osoby provádějící pitvu přídatných pohlavních tkání byly obeznámeny se standardními postupy pitvání těchto tkání. K dispozici je příručka standardních operačních postupů (SOP) pro pitvu vydaná OECD (21). Pečlivý výcvik v souladu s příručkou minimalizuje potenciální zdroj variací ve studii. Za pitvu dané tkáně by měl být ideálně odpovědný tentýž pracovník, aby se zabránilo rozdílům ve zpracování tkání různými osobami. Není-li to možné, měla by být pitva uspořádána tak, že každý pracovník provádí sekci dané tkáně ze všech experimentálních skupin, a nikoli aby jedna osoba prováděla sekci všech tkání z kontrolní skupiny a někdo jiný byl odpovědný za exponované skupiny. Každá přídatná pohlavní tkáň se před osušením zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnosti naměřené u každého zvířete se zaznamenají.

51. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Z předchozí práce vyplynula řada variačních koeficientů (CV), které se podle všeho liší podle odborné způsobilosti té či oné laboratoře. V několika málo případech byly zjištěny velké rozdíly v absolutních hmotnostech tkání, např. VP a COW, v rámci jedné konkrétní laboratoře.

52. Měření hmotnosti jater, párových ledvin a párových nadledvinek je volitelné. Tkáně by opět měly být zbaveny fascií adherens a tuku. Játra se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 g a párové ledviny a párové nadledvinky se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 mg. Játra, ledviny a nadledvinky jsou nejen ovlivněny androgeny; poskytují také užitečné důkazy systémové toxicity.

▼**M5**

53. Měření luteinizačního hormonu (LH), folikulárního stimulujícího hormonu (FSH) a testosteronu (T) v séru je fakultativní. Úrovně T v séru jsou užitečné pro stanovení, zda zkoušená chemická látka vyvolává metabolismus testosteronu v játrech a snižuje úrovně séra. Bez údajů o T by se takový účinek mohl jevit jako výsledek antiandrogenního mechanismu. Úrovně LH poskytují informace o schopnosti určitého antiandrogenu nejen snižovat hmotnost orgánů, ale také ovlivňovat hypothalamo-hypofyzární funkci, což při dlouhodobých studiích může vyvolávat nádory varlat. FSH je hormon důležitý pro spermatogenezi. Dobrovolná jsou rovněž měření séra T4 a T3, která mohou poskytnout užitečné doplňující informace o schopnosti narušovat homeostázu thyroidních hormonů. Mají-li být prováděna hormonální měření, potkani se před pitvou anestetizují a odebere se jim krev srdeční punkcí, přičemž metoda anestezie by měla být pečlivě zvolena tak, aby neovlivnila hormonální měření. Metoda přípravy séra, zdroj souprav pro radioimunologický test nebo jiná měření, analytické postupy a výsledky se zaznamenají. Úrovně LH se zaznamenají v ng na 1 ml séra a rovněž hodnota T se uvede v ng na 1 ml séra.

54. Pitva tkání je popsána dále, přičemž podrobný návod pro pitvu s fotografiemi byl zveřejněn v rámci validačního programu jako doplňující materiál (21). Na webových stránkách Korea Food and Drug Administration je k dispozici také videozáznam pitvy (22).

— Se zvířetem ve ventrální poloze určete, zda se předkožka penisu odpojila od žaludu. Pokud ano, stáhněte předkožku nazad a oddělte žalud, zvažte ho (s přesností na 0,1 mg) a hmotnost zaznamenejte.

— Otevřete kůži na břiše a břišní stěnu, obnažte vnitřnosti. Pokud se provádí volitelné vážení dalších orgánů, oddělte játra a zvažte je s přesností na 0,1 g, oddělte žaludek a střeva, oddělte párové ledviny a párové nadledvinky a zvažte je s přesností na 0,1 mg. Touto sekcí se obnaží močový měchýř a začíná sekce cílových samčích přídatných tkání.

— Pro oddělení VP oddělte močový měchýř od vrstvy ventrálního svalu odříznutím spojovací tkáně podél osy. Odsuňte měchýř anteriorně směrem k semenným váčkům (SV), čímž se odkryje levý a pravý lalok ventrální prostaty (pokryté vrstvou tuku). Opatrně očistěte pravý a levý lalok VP od tuku. Jemně oddalte pravý lalok VP od močové trubice a odřízněte lalok od močové trubice. Zatímco stále držíte pravý lalok VP, jemně oddalte levý lalok VP od močové trubice a poté odřízněte; zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

— Při sekci SVCG odsuňte močový měchýř kaudálním směrem, čímž se odkryje chámovod a pravé a levé lalůčky semenných váčků spolu s koagulačními žlázami (SVCG). Zabraňte úniku tekutiny nasazením hemostatu v basi SVCG, kde se chámovod napojuje na močovou trubici. SVCG opatrně odřízněte, s nasazeným hemostatem stále na místě odstraňte tuk a připojené orgány, vložte do tárované misky vah, sejměte hemostat, zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

▼M5

— Při sekci svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus (LABC) se odkryjí svaly a kořen penisu. Svaly LA obtáčejí tračník a svaly LA anterior a BC jsou připojeny k bulbu penisu. Odstraní se kůže a připojené orgány z perianální oblasti, která se táhne od kořene penisu až po anteriorní konec konečníku. Od bulbu a tkání penisu se postupně odříznou svaly BC. Tračník se rozřízne na dvě části a lze odříznout a oddělit celé LABC. LABC se zbaví tuku a připojených orgánů, zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnost se zaznamená.

— Po odstranění LABC jsou vidět zaoblené Cowperovy nebo též bulbouretrální žlázy (COW) při basi bulbu penisu, poněkud dorzálně. Je nutný opatrný řez, aby nedošlo k prořízntutí tenkého váčku a zamezilo se úniku tekutiny. Zvažte párové COW s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

— Dojde-li během pitvy a sekce ke ztrátě tekutiny z kterékoli žlázy, je třeba to zaznamenat.

55. Jestliže hodnocení každé chemické látky vyžaduje pitvu většího počtu zvířat, než kolik se dá stihnout za jeden den, může být začátek studie rozložen do dvou po sobě jdoucích dnů, což vede k rozložení pitvy a související práce na dva dny. Pokud k takovému rozložení dojde, měla by být každý den použita polovina zvířat z každé experimentální skupiny.

56. Zbývající části mrtvých těl se po pitvě vhodným způsobem zlikvidují.

PŘEKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

57. Měly by být uvedeny údaje o jednotlivých zvířatech (tj. tělesná hmotnost, hmotnost přídatných pohlavních tkání, volitelná měření a další reakce a pozorování) a za každou skupinu zvířat (střední hodnoty a směrodatné odchylky všech uskutečněných měření). Údaje by se měly shrnout do tabulky. Údaje by měly uvádět počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která byla během zkoušky nalezena uhynulá nebo která vykazovala znaky toxicity, a popis pozorovaných znaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti.

58. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkušební zařízení:

— název a místo zařízení,

— vedoucí studie a ostatní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— datum zahájení a datum ukončení studie, tj. první den podávání zkoušené chemické látky a poslední den pitvy.

Zkoušená chemická látka:

— původ, číslo šarže/sady, identifikace, čistota, plná adresa dodavatele a charakterizace zkoušené chemické látky (látek),

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podmínky skladování a metoda a frekvence přípravy roztoku,

— veškeré získané údaje o stálosti,

— veškeré analýzy dávkování roztoků/suspenzí.

▼**M5**

Vehikulum:

— charakterizace vehikula (identifikace, dodavatel a číslo šarže),

— zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata a postupy chovu zvířat:

— druh/kmen a zdůvodnění jejich výběru,

— zdroj nebo dodavatel zvířat, včetně plné adresy,

— počet a stáří dodaných zvířat,

— podmínky chovu (teplota, osvětlení apod.),

— strava (název, typ, dodavatel, číslo šarže, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),

— stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),

— podmínky chovu v kleci a počet zvířat v jedné kleci.

Podmínky zkoušky:

— věk při kastraci a trvání aklimatizace po kastraci,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku studie (s přesností na 0,1 g),

— proces náhodného výběru a záznam o přidělení do skupiny s vehikulem, do referenční skupiny, do skupiny, které se podává zkoušená chemická látka, a do klecí,

— střední hodnota a směrodatná odchylka tělesných hmotností u každé skupiny za každý den vážení po celou dobu studie,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,

— v případě zkoušky na antiandrogenitu, expozice TP (dávka a objem),

— expozice zkoušené chemické látce (dávka a objem),

— doba podávání dávek,

— pitevní postupy, včetně způsobů vykrvení a veškeré anestezie,

— pokud jsou prováděny analýzy séra, měly by být uvedeny podrobnosti o metodě. Je-li například použita metoda radioimunologické analýzy (RIA), měl by být uveden postup RIA, zdroj souprav RIA, datum použitelnosti souprav, postup scintilační spektrometrie a standardizace.

Výsledky:

— každodenní pozorování každého zvířete během podávání dávky, včetně:

— tělesné hmotnosti (s přesností na 0,1 g),

— klinických příznaků (existují-li),

— veškerých měření spotřeby potravy nebo poznámek k ní,

— pozorování při pitvě každého zvířete, včetně:

▼M5

— data pitvy,

— experimentální skupiny zvířat,

— identifikačního čísla,

— jména pracovníka provádějícího pitvu,

— denní doby, kdy byla provedena pitva a sekce,

— věku zvířete,

— konečné tělesné hmotnosti při pitvě, s uvedením veškerých statisticky významných zvýšených nebo snížených hodnot,

— pořadí vykrvácení zvířete a sekcí při pitvě,

— hmotnosti pěti cílových tkání závislých na androgenech:

— ventrální prostata (s přesností na 0,1 mg),

— semenné váčky spolu s koagulačními žlázami, včetně tekutiny (páru, s přesností na 0,1 mg),

— svalový komplex m. levator ani spolu s m. bulbocarvernosus (s přesností na 0,1 mg),

— Cowperovy žlázy (čerstvá hmotnost – párové, s přesností na 0,1 mg),

— žalud penisu (čerstvá hmotnost, s přesností na 0,1 mg),

— hmotnosti tkání měřených fakultativně, provádí-li se:

— játra (s přesností na 0,1 g),

— ledviny (pár, s přesností na 0,1 mg),

— nadledvinky (pár, s přesností na 0,1 mg),

— obecné poznámky a komentáře.

— analýzy hormonů v séru, provádějí-li se

  — sérový LH (fakultativní – ng na 1 ml séra) a

  — sérový T (fakultativní – ng na 1 ml séra)

— obecné poznámky a komentáře.

Shrnutí údajů

Údaje by měly být shrnuty v tabulce obsahující velikost vzorku u každé skupiny, střední hodnotu a standardní odchylku od střední hodnoty nebo směrodatnou odchylku. Tabulky by měly obsahovat tělesné hmotnosti při pitvě, změny tělesné hmotnosti od zahájení podávání dávek až do pitvy, hmotnosti cílových přídatných pohlavních tkání a veškeré hmotnosti orgánů měřené dobrovolně.

Diskuse výsledků

Analýza výsledků

59. Tělesné hmotnosti a hmotnosti orgánů při pitvě se statisticky analyzují za účelem zjištění takových charakteristik, jako je homogenita rozptylu s vhodnou transformací údajů podle potřeby. Experimentální skupiny by měly být porovnány s kontrolní skupinou pomocí technik jako je ANOVA s následnými párovými srovnáními (např. Dunnettův jednostranný test) a porovnáním s kritériem pro hodnocení statistických rozdílů, např. $p \leq 0,05$. Měly by být určeny ty skupiny, které dosahují statistické významnosti. „Relativní hmotnost orgánů“ by však neměla být použita vzhledem k neplatným statistickým předpokladům pro tuto manipulaci s daty.

▼M5

60. V případě androgenního agonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáváno pouze vehikulum. Charakteristiky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání, například trenbolon, který nemůže být redukován 5-alfa-reduktázou, má výraznější účinky na LABC a GP, než jsou účinky TP. Statisticky významné zvýšení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního agonismu a určitý stupeň zvýšení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.

61. V případě androgenního antagonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáván pouze referenční androgen (testosteron propionát). Typické znaky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání; například inhibitory 5-alfa-reduktázy, jako finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně ve srovnání s účinnými antagonisty androgenních receptorů, jako je flutamid. Statisticky významné snížení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) související s aplikací pouze TP by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního antagonismu a určitý stupeň snížení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.

62. Údaje by měly být shrnuty v tabulce obsahující střední hodnotu (průměr), střední chybu průměru (SE) (přijatelná by byla i směrodatná odchylka – SD) a velikost vzorku v každé skupině. Přiloženy by měly být také tabulky s údaji o jednotlivých zvířatech. Individuální hodnoty, střední hodnota, SE (SD) a variační koeficient (CV) pro zvířata kontrolní skupiny by měly být posouzeny, zda splňují stanovená kritéria shody s historickými hodnotami. Variační koeficienty, které převyšují hodnoty CV pro hmotnost každého orgánu uvedené v tabulce 1 (viz odstavce 25 a 26), ukazují, že mohlo dojít k chybě při zaznamenávání nebo vkládání údajů nebo že laboratoř dosud nezvládla přesnou pitvu tkání závislých na androgenech a je nutný další výcvik/praxe. Obecně platí, že variační koeficienty (CV = směrodatná odchylka dělená střední hodnotou hmotnosti orgánu) jsou reprodukovatelné v různých laboratořích a v různých studiích. Předkládané údaje by měly zahrnovat přinejmenším údaje o hmotnostech ventrální prostaty, semenných váčků, svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperových žláz, žaludu penisu, jater a o tělesné hmotnosti a změně tělesné hmotnosti od začátku podávání dávek až do pitvy. Předloženy mohou být také údaje po kovariační úpravě tělesné hmotnosti, ale to by nemělo nahradit předložení neupravených údajů. Dále, nedojde-li v žádné ze skupin k odpojení předkožky, výskyt odpojení předkožky by měl být zaznamenán a mělo by být provedeno jeho statistické srovnání s kontrolní skupinou pomocí *Fisher Exact* testu.

▼**M5**

63. Při ověřování správnosti údajů vložených do počítače porovnáním s původními záznamy by hodnoty hmotností orgánů, které nejsou biologicky reálné nebo se od středních hodnot této experimentální skupiny liší více než o trojnásobek směrodatné odchylky, měly být pečlivě zkontrolovány a možná budou muset být vyloučeny, neboť se pravděpodobně jedná o chyby v záznamu.

64. Porovnání výsledků studie s hodnotami variačních koeficientů OECD (v tabulce 1) je často důležitým krokem při interpretaci validity výsledků studie. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční chemické látky, jako je testosteron propionát a flutamid. Laboratoře mohou rovněž periodicky testovat reakci na známé slabé agonisty a antagonisty androgenů a tyto údaje uchovávat. Tyto údaje mohou být porovnávány s dostupnými údaji OECD, aby se zajistilo, že metody používané laboratoří mají dostatečnou statistickou přesnost a sílu.

▼M5

Dodatek 1

DEFINICE

Androgenní je výraz, který se používá k popisu kladného vlivu na růst tkání závislých na androgenech.

Antiandrogenní je schopnost chemické látky potlačit působení TP u savců.

Citlivostí se rozumí schopnost zkušební metody správně identifikovat chemické látky, které mají vlastnost, jež je testována.

Datem narození se rozumí postnatální den 0.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. V případě Hershbergerovy biologické zkoušky je dávka vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti pokusného zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den).

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

Moribundní stav (agónie) je výraz, který se používá k popisu umírajícího zvířete, tj. těsně před smrtí.

Specifičností se rozumí schopnost zkušební metody správně identifikovat chemické látky, které nemají vlastnost, jež je testována.

Validací se rozumí vědecký proces, který má charakterizovat operační požadavky a omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a vhodnost pro konkrétní účel.

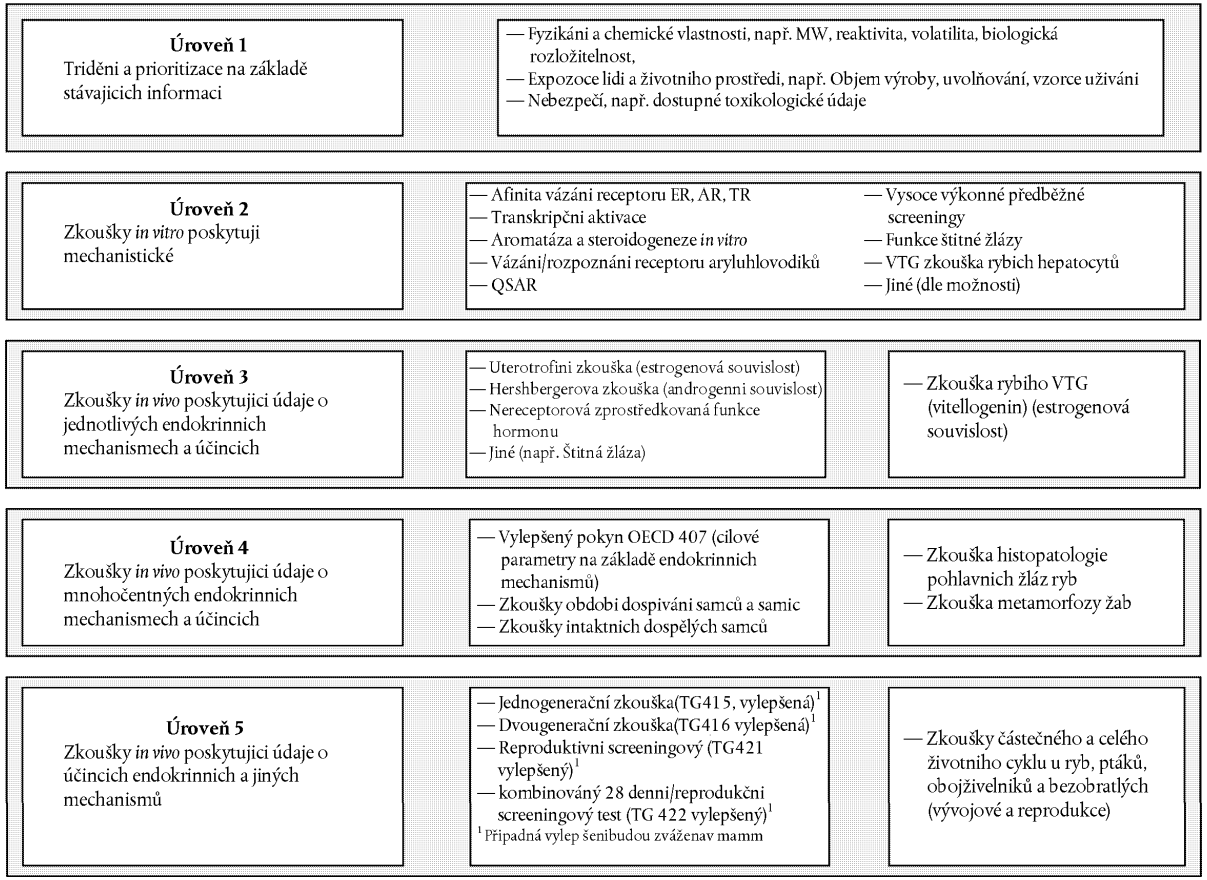
X-tým postnatálním dnem se rozumí x-tý den života po dni narození.

Zkoušenou chemickou látkou se rozumí jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Dodatek 2

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebnich pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedáni pracovni skupiny EDTA

OECD Koncepčni rámec pro zkoušky a hodnoceni endokrinnich distruptorů



VMG mamm: Skupina pro řízení validace zkoušek na savcích

▼M5

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

Poznámka 1: Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.

Poznámka 3: Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.

Poznámka 4: Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.

Poznámka 5: Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímně. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.

Poznámka 6: U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

LITERATURA

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. března 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

▼M5

8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306–1314.

11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, s. 38.

17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

26) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

27) Následující kapitoly v této příloze:

B.1a, akutní orální toxicita – metoda fixní dávky

B.1b, akutní orální toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity

▼M5

B.56 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ STUDIE TOXICITY PRO REPRODUKCI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 443 (2012). Vychází z návrhu Institutu pro vědy o živé přírodě (ILSI), Institutu pro zdravotní a environmentální vědy (HESI) a Technického výboru pro posuzování zemědělsko-chemické bezpečnosti (ACSA), týkajícího se rozšířené jednogenerační studie reprodukce v F_1 generaci publikovaném v dokumentu Cooper et al., 2006 (1). Struktura studie zaznamenala několik vylepšení a vyjasnění s cílemzajistit flexibilitu a zdůraznit, že je důležité začít se stávajícími poznatky, a současně používat průběžná pozorování v životním cyklu k organizaci a modifikaci provádění zkoušek. Tato zkušební metoda poskytuje podrobný popis rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Zkušební metoda popisuje tři kohorty zvířat F_1 generace:

kohorta 1: posuzuje reprodukční/vývojové ukazatele; tuto kohortu lze rozšířit o F_2 generaci.

kohorta 2: posuzuje případný dopad expozice chemické látce na vyvíjející se nervovou soustavu.

kohorta 3: posuzuje případný dopad expozice chemické látce na vyvíjející se imunitní systém.

2. Rozhodnutí o tom, zda hodnotit druhou generaci a vypustit kohortu vývojové neurotoxicity a/nebo kohortu vývojové imunotoxicity, by se měla opírat o stávající poznatky o hodnocené chemické látce, stejně jako o potřeby různých regulačních orgánů. Účelem této zkušební metody je poskytnout podrobné údaje o tom, jak lze studii provádět a jak vyřešit způsob hodnocení jednotlivých kohort.

3. Pro regulační orgány, které pro rozhodování o povinném zařazení druhé generace do postupu testování používají tzv. vnitřních příkazů, byl pro tyto účely vydán pokyn OECD č. 117 (39).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A CÍLE

4. Hlavním cílem rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci je zhodnotit konkrétní životní stadia, která nejsou zahrnuta do jiných typů studií toxicity, a otestovat účinky, které se mohou vyskytnout v důsledku expozice chemické látce v prenatálním a postnatálním stadiu. V případě reprodukčních ukazatelů se předpokládá, že pokud jsou takové údaje dostupné, tak jako první krok jsou pro odhalení účinků na reproduktivní orgány samců a samic použity informace ze studií opakovaného dávkování, např. OECD TG 422 (32)), nebo krátkodobých screeningových zkoušek endokrinních disruptorů, (např. Uterotrofní zkouška – zkušební metoda B.54 (36) a Hershbergerova zkouška – zkušební metoda B.55 (37)). To může zahrnovat údaje o spermatogenezi (histopatologické vyšetření varlat) u samců a estrální cyklus, počty folikulů/zrání oocytů a integrita vaječníků (histopatologické vyšetření) u samic. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poté slouží jako zkouška reprodukčních ukazatelů, které vyžadují interakci samců se samicemi, samic se zárodkem a samic s potomstvem a F_1 generací až do doby po dosažení pohlavní zralosti (viz pokyn OECD č. 151 podporující tuto zkušební metodu (40)).

▼M5

5. Tato zkušební metoda má poskytnout hodnocení prenatálních a postnatálních účinků chemických látek na vývoj, jakož i důkladné zhodnocení systémové toxicity u březích samic a samic v době laktace a u mladého a dospělého potomstva. Očekává se, že při podrobném zkoumání klíčových vývojových ukazatelů, jakými jsou životaschopnost potomstva, neonatální zdraví, vývojový stav při narození a fyzický a funkční vývoj do dospělosti, budou určeny konkrétní cílové orgány v potomstvu. Studie navíc poskytne a/nebo potvrdí informace o účincích zkoušené chemické látky na integritu a výkonnost rozmnožovací soustavy dospělých samců a samic. V úvahu jsou brány konkrétně, nikoli však výlučně tyto parametry: funkce pohlavních žláz, estrální cyklus, zrání epididymálních spermií, způsob chování při páření, plození, březost, vrh a laktace. Dále budou informace získané z posouzení vývojové neurotoxicity a vývojové imunotoxicity charakterizovat potenciální účinky v těchto systémech. Údaje odvozené z těchto zkoušek by měly umožnit určení dávek bez pozorovaného nepříznivého účinku (*No-Observed Adverse Effect Levels* – NOAEL), dávek s nejnižším pozorovaným nepříznivým účinkem (*Lowest Observed Adverse Effect Levels* – LOAEL) a/nebo referenčních dávek pro různé ukazatele a/nebo by měly být využity k charakterizaci účinků zjištěných v předchozích studiích s opakovaným dávkováním a/nebo by měly sloužit jako návod pro následné zkoušky.

6. Schéma zkušebního postupu obsahuje obrázek 1. Zkoušená chemická látka je podávána nepřetržitě ve stupňovaných dávkách několika skupinám pohlavně zralých samců a samic. Této rodičovské generaci (P) jsou dávky podávány po stanovené období před pářením (vybráno na základě dostupných informací pro zkoušenou chemickou látku, ale minimálně po dobu dvou týdnů) a po dvoutýdenní období páření. Samcům z P generace jsou dávky podávány dále nejméně až do odstavení generace F_1. Dávky by měli dostávat minimálně 10 týdnů. Je-li nutné objasnit účinky na reprodukci, mohou dávky dostávat déle. Podávání dávek samicím P generace pokračuje během březosti a laktace až do utracení po odstavení jejich vrhu (tj. 8–10 týdnů aplikace). Potomstvo z generace F_1 dostává další dávky zkoušené chemické látky od odstavení až do dospělosti. Pokud je hodnocena druhá generace (viz pokyn OECD č. 117 (39)), potomci z generace F_1 budou dávky dostávat až do odstavení generace F_2 nebo až do ukončení studie.

7. U všech zvířat se provádějí klinická pozorování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na zdraví, růst, vývoj a funkci jejich potomstva. Při odstavení jsou vybraní potomci zařazeni do konkrétních podskupin (kohorty č. 1–3, viz odstavce 33 a 34 a obrázek 1), kde jsou dále zkoumáni, včetně pohlavní zralosti, integrity a funkce reprodukčních orgánů, ukazatelů v oblasti neurologie a chování a funkcí imunity.

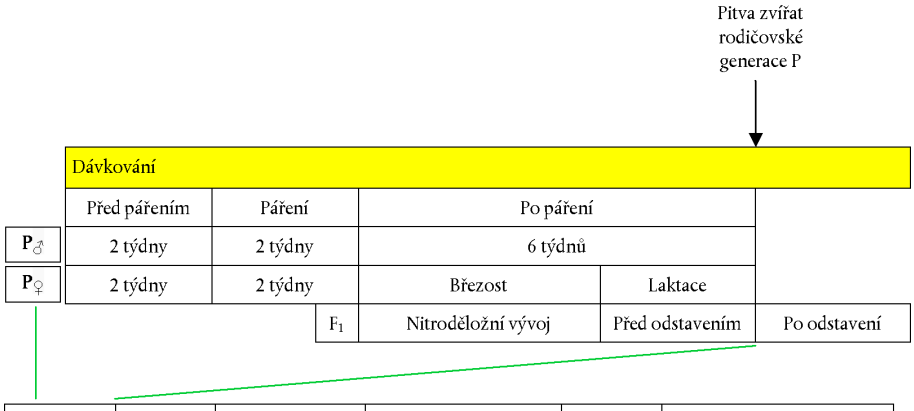
8. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických znaků jako humánních ukazatelů pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (34).

▼M5

9. Až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude zkušební metoda přezkoumána a v případě potřeby bude tato zkušební metoda revidována z hlediska nabytých zkušeností.

Obrázek 1

Schéma rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci



Rodičovská generace	Kohorta	Pojmenování	Počet zvířata/kohortu	Pohlavní zralost	Přibližné stáří při pitvě (v týdnech)
Cílem je 20 vrhů na skupinu	1A	Reprodukční	20 samců + 20 samic	Ano	13
	1B	Reprodukční	20 samců + 20 samic	Ano	14 nebo 20-25, pokud dojde k vyvolání
	2A	Neurotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ano	11-12
	2B	Neurotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ne	3
	3	Imunotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ano	8
	Přebytek	Náhrady		Ne	3

@ Pokud možno jeden na vrh a celkově je třeba reprezentovat všech 20 vrhů, pokud je to možné

POPIS METODY/PŘÍPRAVY NA ZKOUŠKU

Zvířata

Výběr živočišných druhů a kmenů

10. Výběr druhů pro zkoušku toxicity pro reprodukci by měl být pečlivě zvážen z hlediska veškerých dostupných informací. Avšak vzhledem k rozsahu existujících základních údajů a vzhledem ke srovnatelnosti s výsledky obecných zkoušek toxicity je obvykle upřednostňovaným druhem potkan a právě na tento druh odkazují kritéria a doporučení uvedená v této zkušební metodě. Pokud je použit jiný živočišný druh, měl by být jeho výběr odůvodněn a bude nutné patřičným způsobem upravit zkušební postup. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem spontánních vývojových vad.

Kritéria pro stáří, tělesnou hmotnost a zařazení do skupin

11. Měla by být použita zdravá rodičovská zvířata, která nebyla předtím podrobena žádným pokusům. Měli by být zkoumáni samci i samice, samice by měly být nulipary a neměly by být březí. Zvířata z P generace by měla být pohlavně zralá, měla by mít v době zahájení podávání dávek podobnou hmotnost (v rámci pohlaví), měla by být podobně stará (přibližně 90 dní) při páření a měla by být reprezentativní v rámci zkoumaného druhu a kmene. Zvířata by se měla po dobu nejméně pěti dnů po přejímce aklimatizovat. Zvířata jsou náhodně rozřazena do kontrolních skupin a experimentálních skupin tak, že výsledkem jsou srovnatelné střední hodnoty tělesné hmotnosti (tj. ±20 % střední hodnoty).

▼M5

Podmínky chovu a krmení

12. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3°). Relativní vlhkost by se měla pohybovat mezi 30 a 70 %, přičemž ideální je rozmezí od 50 do 60 %. Umělé osvětlení by mělo svítit 12 hodin a 12 hodin by měla být tma. Může být použita konvenční laboratorní potrava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Zvláštní pozornost by se měla věnovat obsahu fytoestrogenů ve stravě, jelikož vysoká míra fytoestrogenu ve stravě by mohla ovlivnit některé reproduktivní ukazatele. Je doporučena standardizovaná strava s nestanoveným složením, v níž byly omezeny látky obsahující estrogeny (2) (30). Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Měl by být ověřen obsah, homogenita a stabilita zkoušené chemické látky v potravě. Měla by být pravidelně prováděna analýza krmiva a pitné vody z hlediska příměsí. Vzorky každé šarže potravy používané během studie by měly být až do dokončení zprávy uchovávány za vhodných podmínek (např. zmrazené při – 20 °C) pro případ, že bude nutné provést další analýzu složek potravy.

13. Zvířata by měla být umístěna do klecí v malých skupinách obsahujících zvířata stejného pohlaví a experimentální skupiny. Zvířata lze chovat jednotlivě, aby se předešlo případným zraněním (např. samci po období páření). Páření by mělo probíhat ve vhodných klecích. Po spáření je třeba umístit samice, u nichž se předpokládá, že byly oplodněny, odděleně do porodních nebo mateřských klecí, kde jim je poskytnut odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda. Mláďata jsou až do odstavení se svými matkami. Zvířata F_1 generace by měla být umístěna v malých skupinách téhož pohlaví a experimentální skupiny od odstavení až do utracení. Je-li to vědecky odůvodněno, mohou být zvířata umístěna samostatně. Obsah fytoestrogenů obsažených ve vybraném materiálu pro podestýlku by měla být minimální.

Počet a identifikace zvířat

14. Každá zkušební a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet spářených párů, aby mohlo být dosaženo alespoň dvaceti březích samic v jedné dávkové skupině. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti dané chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samic generace P, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí až do dospělosti. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat, nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu s uvážením možného příčinného vztahu ke zkoušené chemické látce.

15. Každému zvířeti P generace se před podáváním dávek přiřadí vlastní identifikační číslo. Naznačují-li laboratorní historické údaje, že významná část samic nemusí vykazovat pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus, je doporučeno provést před aplikací posouzení estrálního cyklu. Případně lze velikost skupiny zvýšit, aby bylo zajištěno, že alespoň dvacet samic v každé skupině bude mít při zahájení aplikace pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus. Veškeré potomstvo z F_1 generace dostane vlastní identifikaci při první prohlídce novorozených mláďat v postnatální den (PND) 0 nebo 1. Záznamy označující vrh, z kterého pochází, by měly být uchovávány pro všechna zvířata F_1 generace, příp. zvířata F_2 generace po celou dobu studie.

▼M5

Zkoušená chemická látka

Dostupné informace o zkoušené chemické látce

16. Průzkum existujících informací je důležitý pro rozhodnutí o způsobu podání, výběru vehikula, volbě živočišných druhů, volbě dávkování a potenciálních modifikacích dávkovacího programu. Z tohoto důvodu by při plánování rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci měly být vzaty v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, tj.fyzikálně-chemické vlastnosti, toxikokinetika (včetně metabolismu specifického pro daný druh), toxikodynamické vlastnosti, vztahy mezi strukturou a aktivitou (SAR), metabolické procesy *in vitro*, výsledky předchozích studií toxicity a příslušné informace pro strukturní analogy dané látky. Předběžné informace o absorpci, distribuci, metabolismu a eliminaci (ADME) a bioakumulaci lze odvodit z chemické struktury, fyzikálně-chemických údajů, míry vázání plazmatických bílkovin nebo toxikokinetických (TK) studií, zatímco doplňující informace jsou získávány z výsledků studií o toxicitě, např. o NOAEL, metabolismu nebo indukci metabolismu.

Zohlednění toxikokinetických údajů

17. Ačkoli to není vyžadováno, toxikokinetické údaje z dříve provedených předběžných studií pro stanovení rozmezí dávek nebo jiných studií jsou mimořádně užitečné při plánování struktury studie, volbě úrovní dávek a interpretaci výsledků. Užitečné jsou zejména ty údaje, které: 1) ověřují expozici vyvíjejících se plodů a mláďat zkoušené chemické látce (nebo příslušným metabolitům), 2) poskytují odhad interní dozimetrie, a 3) hodnotí potenciální saturaci kinetických procesů v závislosti na dávkách. Jsou-li k dispozici, měly by být zohledněny i další toxikokinetické údaje, jako jsou profily metabolitů, vývoj koncentrace v čase atd. Během hlavní studie lze shromáždit i doplňující toxikokinetické údaje za předpokladu, že tento sběr nezasahuje do sběru a interpretace ukazatelů hlavní studie.

Obecně při plánování rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci je užitečné zařadit následující soubory toxikokinetických údajů:

— pozdní březost (např. den gestace 20) – krev matky a krev plodu,

— střední laktace (PND 10) – krev matky, krev mláděte a/nebo mléko,

— brzké odstavení (např. PND 28) – krevní vzorky odstaveného mláděte.

Při určování specifických analytů (např. chemická látka a/nebo metabolity u rodičů) a schématu odběru vzorků je zapotřebí postupovat flexibilně. Například počet a načasování sběru vzorků v daný den odběru vzorků bude záviset na způsobu expozice a předchozích znalostech toxikokinetických vlastností u zvířat, která nejsou březí. U studií potravy stačí odběr vzorků v jeden pevný čas v každý z těchto dnů, zatímco podávání dávek žaludeční sondou může vyžadovat další časy odběru vzorků pro získání lepšího odhadu rozmezí interních dávek. Není však nutné generovat v kterýkoli z dnů odběru vzorků úplný vývoj koncentrace v čase. V nezbytném případě může být krev pro fetální a neonatální analýzu smíchána podle pohlaví v rámci vrhů.

▼M5

Způsob podání

18. Při volbě způsobu podání by měl být zohledněn způsob, případně způsoby, které jsou nejdůležitější z hlediska expozice člověka. Ačkoli zkušební postup je popsán pro podávání zkoušené chemické látky ve stravě, může být upraven pro podávání jinými způsoby (pitnou vodou, žaludeční sondou, inhalací, kůží) v závislosti na vlastnostech dané chemické látky a požadovaných informacích.

Volba vehikula

19. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Je doporučeno, je-li to možné, nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/suspenze v oleji (např. kukuřičném oleji). U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Neměla by být používána vehikula s vlastní toxicitou (např. aceton, DMSO). Měla by být určena stabilita zkoušené chemické látky v daném vehikulu. Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiné aditivum, měla by být věnována pozornost jeho následujícím charakteristikám: účinkům na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinkům na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinkům na spotřebu potravy nebo vody nebo nutriční stav zvířat.

Výběr dávky

20. Studie by zpravidla měla obsahovat nejméně tři úrovně dávek a souběžnou kontrolu. Při výběru vhodných úrovní dávek by experimentátor měl zvážit všechny dostupné informace, včetně informací o dávkování z předchozích studií, toxikokinetických údajů získaných z březích nebo nebřezích zvířat, rozsahu laktačního transferu a odhadů expozice člověka. Jsou-li k dispozici toxikokinetické údaje, které uvádějí saturaci toxikokinetických procesů v závislosti na dávkách, je zapotřebí se vyvarovat vysokých úrovní dávek, které jasně ukazují saturaci, ovšem za předpokladu, že se očekává, že expozice lidí budou výrazně nižší než bod saturace. V takových případech by nejvyšší úroveň dávek měla být na úrovni inflexního bodu pro přechod na nelineární toxikokinetické chování nebo jen mírně nad ním.

21. Nejsou-li k dispozici příslušné toxikokinetické údaje, úrovně dávek by měly vycházet z toxických účinků, nejsou-li omezeny fyzikální/chemickou povahou zkoušené chemické látky. Pokud se úrovně dávek opírají o toxicitu, nejvyšší dávka by měla být vybrána s cílem vyvolat určitou systémovou toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení zvířat.

22. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a stanovit hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo dávky blízko limitu detekce, které by umožnily odvození referenční dávky pro nejcitlivější ukazatel(e). S cílem předejít velkým rozmezím dávek mezi NOAEL a LOAEL jsou často optimální dvojnásobné až čtyřnásobné intervaly. Často je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velký interval (např. odpovídající faktoru většímu než 10) mezi dávkami.

23. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Této skupině se nepodává žádná látka nebo tvoří kontrolní skupinu s napodobeným podáváním nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené chemické látky vehikulum používá. Používá-li se vehikulum, mělo by se kontrolní skupině podat v nejvyšším používaném objemu.

▼M5

Limitní zkouška

24. Pokud není prokázána toxicita u dávky nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den ve studiích s opakovaným dávkováním nebo pokud se toxicita neočekává ani na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných chemických látkách, naznačujících podobnost metabolických vlastností *in vivo/in vitro*, pak studie s několika dávkami nemusí být nutná. V takových případech rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci může být provedena s kontrolní skupinou s jednou dávkou o velikosti nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den. Pokud však bude toxicita pro reprodukci nebo vývoj v této limitní dávce nalezena, budou pro identifikaci NOAEL požadovány další studie při nižších úrovních dávek. Tyto úvahy o limitní zkoušce se uplatňují pouze tehdy, když expozice člověka nenaznačuje nutnost vyšší úrovně dávky.

POSTUPY

Expozice potomstva

25. Upřednostňovaným způsobem podání je expozice v potravě. Pokud se provádějí studie s podáváním látky žaludeční sondou, je zapotřebí poznamenat, že mláďata budou dostávat zkoušenou chemickou látku pouze nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích s podáváním látky v potravě nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou chemickou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktačního období sama žrát. Pokud je vylučování zkoušené chemické látky v mléce špatné a pokud je nedostatek dokladů o nepřetržité expozici potomstva, měly by být zváženy modifikace uspořádání studie. V těchto případech by mělo být zváženo na základě dostupných toxikokinetických informací, toxicity u potomstva nebo změnách biomarkerů (3) (4) přímé podávání dávek mláďatům v laktačním období. Před provedením studií přímého podávání dávek kojeným mláďatům (5) by měly být pečlivě zváženy přínosy a nevýhody.

Plán dávkování a podávání dávek

26. Z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování, které měly adekvátní trvání, mohou být k dispozici určité informace o estrálních cyklech, histopatologických vyšetřeních samčího a samičího pohlavního ústrojí a analýze varlat/epididymálních spermií. Délka expozice před pářením v rámci rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci se tudíž zaměřuje na odhalení účinků na funkční změny, které mohou zasáhnout do způsobu chování při páření a do oplodnění. Expozice před pářením by měla být dostatečně dlouhá kvůli tomu, aby bylo dosaženo stálých podmínek expozice u samců i samic P generace. Ve většině případů se za adekvátní pro obě pohlaví považuje dvoutýdenní expozice před pářením. U samic zahrnuje tři až čtyři celé estrální cykly a měla by stačit k odhalení jakýchkoli negativních účinků na cykly. U samců toto trvání odpovídá době požadované pro epididymální přechod zrajících spermií a mělo by umožnit odhalení posttestikulárních účinků na spermie při páření (během konečných stadií spermiace a epididymálního zrání spermií). V době utracení, kdy je naplánováno histopatologické vyšetření varlat a nadvarlat a analýza parametrů spermií, budou samci P a F_1 generace mít za sebou expozici pro nejméně jeden celý spermatogenní proces ((6) (7) (8) (9) a pokyn OECD č. 151 (40)).

▼M5

27. Scénáře expozice samců před pářením lze přizpůsobit, pokud v předchozích studiích byla jasně identifikována toxicita pro varlata (zhoršení spermatogeneze) nebo účinky na integritu a funkci spermatu. Podobně i u samic mohou známé účinky zkoušené chemické látky na estrální cyklus, a tudíž i pohlavní citlivost odůvodnit různé scénáře expozice před pářením. Ve zvláštních případech lze akceptovat, aby aplikace u samic P generace byla zahájena až po získání stěru pozitivního na spermie (viz pokyn OECD č. 151 (40)).

28. Po stanovení období podávání dávek před pářením by měla být zvířatům zkoušená chemická látka podávána nepřetržitě po dobu sedmi dnů v týdnu až do pitvy. Všem zvířatům by měly být dávky podávány stejným způsobem. Podávání dávek by mělo pokračovat během dvoutýdenního páření a u samic P generace po dobu gestace a laktace až do jejich utracení po odstavení mláďat. U samců by aplikace měla probíhat stejným způsobem až do utracení v době, kdy jsou zvířata F_1 generace odstavena. U pitvy by přednost měla být dána samicím, které by měly být pitvány ve stejném/přibližně stejném dni laktace. Pitvu samců lze v závislosti na laboratorních možnostech rozložit na dobu většího počtu dnů. Nebylo-li přímé podávání dávek vybraným samcům a samicím F_1 generace zahájeno již během období laktace, mělo by začít při odstavení a mělo by pokračovat až do naplánované pitvy v závislosti na zařazení do kohorty.

29. U chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v potravě, lze uplatňovat buď konstantní koncentraci v potravě (ppm) nebo konstantní úroveň dávek z hlediska tělesné hmotnosti zvířete; vybraná možnost by měla být specifikována.

30. Při podávání zkoušené chemické látky žaludeční sondou by objem jednorázově podané kapaliny neměl zpravidla překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti je maximum pro olej, např. kukuřičný olej). S výjimkou dráždivých nebo žíravých chemických látek, kde se ve vyšších koncentracích obvykle ukáže další zhoršení účinků, se proměnlivost množství zkoušené látky sníží nastavením takové koncentrace, která zajistí konstantní množství na všech úrovních dávek. Aplikace by měla být prováděna každý den zhruba ve stejnou dobu. Dávka pro každé zvíře by měla zpravidla vycházet z posledního individuálního určení tělesnéhmotnosti a měla by být upravována nejméně jednou týdně u dospělých samců a dospělých nebřezích samic a jednou za dva dny u březích samic a zvířat F_1 generace, pokud je podávána před odstavením a v průběhu dvou týdnů po odstavení. Naznačují-li toxikokinetické údaje nízký placentární přenos zkoušené chemické látky, může být nutné podávání žaludeční sondou v posledním týdnu březosti upravit tak, aby březí samici nebyla podána příliš toxická dávka. Samicím by chemická látka v den vrhu neměla být podávána žaludeční sondou ani žádným jiným způsobem, při kterém se se zvířaty musí manipulovat; v tento den se upřednostňuje zkoušenou chemickou látku nepodávat a nerušit proces porodu.

▼M5

Páření

31. Každá samice P generace by měla být umístěna s jedním, náhodně vybraným, nepříbuzným samcem z téže dávkové skupiny (páření 1:1) až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Pokud je nedostatek samců, například z důvodu jejich uhynutí před pářením, lze samce, který/kteří se již spářil/i, pářit (1:1) s druhou samicí, aby byly spářeny všechny samice. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). Zvířata by měla být oddělena co nejdříve po zpozorování důkazů o spáření. Nedošlo-li ke spáření do dvou týdnů, zvířata by měla být oddělena bez další možnosti páření. Spářené páry se v záznamech jasně označí.

Velikost vrhu

32. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu pěti samců a pěti samic z jednoho vrhu. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti, není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice).

Výběr mláďat pro studie po odstavení (viz obrázek 1)

33. Pro další zkoumání je při odstavení (kolem PND 21) mláďat ze všech dostupných vrhů vybráno až do 20 jedinců na jednu dávkovou skupinu a také kontrolní skupina a tento stav je udržován až do pohlavní zralosti (pokud nejsou vyžadovány dřívější zkoušky). Jedinci jsou vybíráni náhodně s tou výjimkou, že by neměla být do těchto skupin zařazována zakrslá mláďata (zvířata s tělesnou hmotností, jež je o dvě směrodatné odchylky nižší než střední hmotnost mláďat v příslušném vrhu), jelikož nejsou pravděpodobně reprezentativními zástupci experimentální skupiny.

V PND 21 jsou vybraní jedinci F_1 generace následujícím způsobem náhodně zařazeni do jedné ze tří kohort zvířat:

kohorta 1 (1 A a 1B)= zkoušení toxicity pro reprodukci/vývoj,

kohorta 2 (2 A a 2B)= zkoušení vývojové neurotoxicity,

kohorta 3= zkoušení vývojové imunotoxicity.

Kohorta 1 A: jeden samec a jedna samice z vrhu a skupiny (20/pohlaví/skupinu): prioritní výběr pro primární posouzení účinků na rozmnožovací soustavu a hodnocení obecné toxicity.

Kohorta 1B: jeden samec a jedna samice z vrhu a skupiny (20/pohlaví/skupinu): prioritní výběr pro následné posouzení reprodukčního výkonu pářením zvířat F_1 generace, když je to předepsáno (viz pokyn OECD č. 117 (39)), a pro získání dalších údajů o histopatologických vyšetřeních v případě podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty nebo v případě, kdy jsou výsledky z kohorty 1 A dvojznačné.

Kohorta 2 A: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; jeden samec nebo jedna samice z každého vrhu) přidělených pro účely neurobehaviorálních zkoušek následovaných neurohistopatologickým posouzením u dospělých.

Kohorta 2B: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; jeden samec nebo jedna samice z každého vrhu) přidělených pro účely neurohistopatologického posouzení při odstavení (PND 21 nebo PND 22). Pokud není dostatek zvířat, měla by být zvířata přednostně zařazena do kohorty 2 A.

▼M5

Kohorta 3: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; pokud možno z každého vrhu jeden jedinec). Další mláďata z kontrolní skupiny mohou být použita pro pozitivní kontrolu při zkoušce protilátkové odezvy závislé na T buňkách (TDAR) v PND 56 ± 3.

34. Pokud by ve vrhu byl nedostatek mláďat na to, aby mohla být zařazena do všech kohort, má přednost kohorta č. 1, jelikož může být rozšířena o produkci F_2 generace. V případě specifické potřeby lze do kterékoli z kohort zařadit další mláďata, např. pokud existuje podezření, že daná chemická látka je neurotoxikant, imunotoxikant nebo reproduktivní toxikant. Tato mláďata lze využít ke zkouškám v jiných časových intervalech nebo pro hodnocení doplňujících ukazatelů. Mláďata, která nebudou zařazena do kohort, budou podrobena klinickým biochemickým vyšetřením (odstavec 55) a celkové pitvě (odstavec 68).

Druhé páření zvířat P generace

35. Druhé páření není u zvířat P generace zpravidla doporučováno, jelikož probíhá na úkor ztráty důležitých informací o počtu implantačních míst (a tedy údajů o postimplantačních a perinatálních ztrátách, indikátorů o možném teratogenním potenciálu) pro první vrh. Potřeba ověřit nebo objasnit účinek u samic, které byly vystaveny expozici, by byla uspokojena lépe, pokud by studie byla rozšířena o páření F_1 generace. Avšak druhé páření samců P generace se samicemi, kterým nebyla podávána daná chemická látka, je vždy možností, jak vyjasnit nejednoznačné nálezy nebo dále charakterizovat účinky na plodnost pozorované při prvním páření.

POZOROVÁNÍ ŽIVÝCH ZVÍŘAT

Poznatky z klinického pozorování

36. U zvířat P generace a vybraných zvířat F_1 generace se všeobecné klinické pozorování provádí jednou denně. V případě podávání dávek žaludeční sondou by klinické pozorování mělo proběhnout před podáním a po podání dávky (za účelem zjištění případných známek toxicity spojených se špičkovou koncentrací plazmy). Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Dvakrát denně, o víkendech jednou denně, se provede vyšetření všech zvířat za účelem zjištění závažné toxicity, morbidity a mortality.

37. Navíc se jednou týdně provede podrobnější vyšetření všech zvířat P a F_1 generace (po odstavení), přičemž toto vyšetření lze příhodně provádět při vážení zvířete, což by minimalizovalo stres z manipulace. Pozorování by měla být prováděna pečlivě a měla by být zaznamenávána pomocí systémů hodnocení, které byly definovány zkušební laboratoří. Je třeba se pokusit zajistit, aby rozdíly mezi podmínkami zkoušek byly minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např.slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např.vytrvalých čistících pohybů nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např.sebepoškozování, pohybu pozpátku).

▼M5

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

38. Zvířata P generace jsou vážena první den podání dávky a poté nejméně jednou týdně. Kromě toho jsou samice P generace váženy během laktace ve stejné dny, ve které probíhá vážení mláďat z jejich vrhů (viz odstavec 44). Všechna zvířata F_1 generace jsou vážena individuálně při odstavení (PND 21) a poté nejméně jednou týdně. Tělesná hmotnost je také zaznamenána v den, kdy dosáhnou puberty (dokončení odloučení předkožky nebo vaginální průchodnost). Všechna zvířata jsou vážena při utracení.

39. Během studie je nejméně jednou týdně ve stejné dny jako vážení tělesné hmotnosti zvířat (s výjimkou období kohabitace) zaznamenávána spotřeba potravy a vody (v případě podávání zkoušené chemické látky v pitné vodě). Spotřeba potravy v každé kleci zvířat F_1 generace je počínaje výběrem do příslušné kohorty zaznamenávána jednou týdně.

Estrální cykly

40. Předběžné informace o účincích zkoušené chemické látky na estrální cyklus mohou být k dispozici již z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování a lze je použít při sestavování zkušebního postupu specifického pro zkoušenou chemickou látku, který se týká rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Hodnocení estrálních cyklů (při vaginální cytologii) začne zpravidla na začátku období expozice a bude pokračovat až do potvrzení páření nebo do konce dvoutýdenního období páření. Pokud před aplikací proběhl screening samic z hlediska normálního estrálního cyklu, je pak vhodné pokračovat se stěry i po zahájení aplikace. Pokud však existuje podezření na nespecifické účinky při zahájení expozice (např. počáteční výrazné snížení spotřeby potravy), může být zvířatům dána možnost adaptace na expozici po dobu až dvou týdnů před zahájením dvoutýdenního období odběru stěrů trvajícího až do páření. Pokud je období expozice látce samicím takto prodlouženo (tj. na čtyřtýdenní aplikaci před pářením), měl by být zvážen nákup mladších zvířat a prodloužení období expozice samců před pářením. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně tak nevyvolat stav falešné březosti (10) (11).

41. Vaginální stěry by měly být od začátku vaginální průchodnosti zkoumány každý den u všech samic F_1 generace v kohortě 1 A, dokud nebude zaznamenán první stěr zrohovatělých buněk, aby bylo možno určit časový interval mezi těmito dvěma událostmi. Estrální cykly všech samic F_1 generace v kohortě 1 A by měly být monitorovány po dobu dvou týdnů, a to přibližně od PND 75. Kromě toho, bude-li nutné páření F_1 generace, bude po období spárování až okamžiku odhalení důkazů o spáření následovat vaginální cytologie v kohortě 1B.

Páření a březost

42. Kromě standardních ukazatelů (např. tělesná hmotnost, spotřeba potravy, klinická pozorování včetně kontroly mortality/morbidity), jsou zaznamenána data páření, datum oplodnění a datum vrhu a vypočítá se prekoitální interval (páření až oplodnění) a trvání březosti (oplodnění až vrh). Samice P generace by měly být v době očekávaného vrhu pečlivě prohlédnuty, zda nevykazují známky dystokie. Měly by být zaznamenány jakékoli anomálie při tvorbě hnízda nebo péči o mláďata.

▼M5

43. Den, kdy dojde k vrhu, je pro samici nultý den laktace (LD 0) a pro potomstvo nultý postnatální den (PND 0). Případně mohou veškerá srovnání vycházet také z postkoitální doby, aby se eliminovaly nejasnosti v údajích o postnatálním vývoji na základě rozdílů v trvání březosti; mělo by být však zaznamenáno i načasování v souvislosti s vrhem. To je důležité zejména tehdy, když zkoušená chemická látka vykazuje vliv na trvání březosti.

Parametry potomstva

44. Vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (PND 0 nebo 1), aby bylo možno stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií (z vnějšku patrné anomálie, mezi něž patří rozštěp patra, podkožní krevní výrony, abnormální barva nebo textura kůže, přítomnost pupeční šňůry, nedostatek mléka v žaludku, přítomnost suchých sekretů). Kromě toho první klinické vyšetření novorozených mláďat zahrnuje kvalitativní hodnocení tělesné teploty, stav aktivity a reakci na manipulaci. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v PND 0 nebo později, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti. Živá mláďata se spočítají, každé se zváží v PND 0 nebo PND 1 a poté v pravidelných intervalech, např. alespoň v PND 4, 7, 14 a 21. Klinické vyšetření dle stáří zvířat se zopakuje při vážení potomstva nebo častěji, pokud byly při narození učiněny specifické nálezy. Zaznamenané příznaky by mohly mimo jiné zahrnovat externí anomálie, změny kůže, srsti, očí, sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí. Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování nebo bizarního chování.

45. U každého mláděte je třeba nejméně jednou v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (12). V PND 12 nebo 13 se zkontroluje přítomnost bradavek/prsních dvorců u mladých samců.

46. Všechna vybraná zvířata F_1 generace jsou každý den posuzována z hlediska odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic, anebo tato pozorování mohou započít před dnem, kdy se očekává dosažení těchto ukazatelů, aby se zjistilo, zda pohlavní zralost nastane brzy. Zaznamenají se jakékoli anomálie pohlavních orgánů, jako je perzistentní vaginální vlákno, hypospadie nebo rozštěp penisu. Pohlavní zralost zvířat F_1 generace je porovnána s fyzickým vývojem při určení stáří a tělesné hmotnosti v případě odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic (13).

Posouzení potenciální vývojové neurotoxicity (kohorty 2 A a 2B)

47. Pro posouzení neurotoxicity se použije deset samců a deset samic z kohorty 2 A a deset samců a deset samic z kohorty 2B z každé experimentální skupiny (za každou kohortu: jeden samec nebo jedna samice z vrhu; všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr). U zvířat z kohorty 2 A jsou posuzovány reakce na nečekané zvukové podněty, je provedena funkční pozorovací baterie, je provedeno vyšetření motorické činnosti (viz odstavce 48–50) a neuropatologická vyšetření (viz odstavce 74–75). Je třeba zajistit, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách jen minimální a nesouvisely systematicky s aplikací. Mezi proměnnými, které mohou ovlivnit chování, jsou hladina zvuku (např. přerušovaný hluk), teplota, vlhkost, osvětlení, zápachy, denní doba a odchylky v životním prostředí. Výsledky zkoušek neurotoxicity by měly být interpretovány v souvislosti s náležitými historickými kontrolními referenčními rozmezími. Zvířata kohorty 2B by měla být použita k neuropatologickému posouzení v PND 21 nebo 22 (viz odstavce 74–75).

▼**M5**

48. Zkouška odezvy na nečekané zvukové podněty se provede v PND 24 (± 1 den) na zvířatech z kohorty 2 A. Den zkoušek by měl být rovnoměrně rozložen napříč skupinami, jimž je podávána daná chemická látka, a kontrolními skupinami. Každá sekce je tvořena 50 pokusy. Při provádění zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty se stanoví střední reakční amplituda v každém bloku deseti pokusů (pět bloků o deseti pokusech), přičemž zkušební podmínky by měly být optimalizovány tak, aby byla zajištěna habituace uvnitř sekce. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).

49. Ve vhodnou dobu mezi PND 63 a PND 75 jsou zvířata z kohorty 2 A podrobena funkční pozorovací baterii a automatizované zkoušce motorické činnosti. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušebními metodami B.43 (33) a B.53 (35). Součástí funkční pozorovací baterie je důkladný popis vzhledu, chování a funkční integrity subjektu. Tyto parametry se hodnotí na základě pozorování v chovné kleci, po přesunu do standardního pozorovacího prostoru (otevřený prostor), kde se zvíře pohybuje volně, a při manipulačních zkouškách. Při zkouškách se postupuje od té nejméně až po tu nejvíce interaktivní. Seznam sledovaných parametrů je uveden v dodatku 1. Všechna zvířata by měla být pečlivě pozorována zkušenými pracovníky, kteří nemají informaci o skupině, do které zvíře patří, za použití standardizovaných postupů, které by měly minimalizovat variabilitu způsobenou pozorovatelem. Doporučuje se, aby zvířata hodnotila v dané zkoušce pokud možno tatáž osoba. Není-li to možné, je potřebné mít nějaký odhad spolehlivosti mezi osobami provádějících vyšetření. U každého parametru funkční pozorovací baterie se používají explicitní definované stupnice a kritéria hodnocení. Pro ukazatele, kde se používá subjektivní posouzení, je třeba definovat objektivní kvantitativní kritéria. V případě motorické činnosti je každé zvíře testováno individuálně. Zkouška by měla trvat dostatečně dlouho na to, aby u kontrolní skupiny mohla být prokázána habituace v rámci sekce. Motorická činnost se monitoruje pomocí zařízení pro automatický záznam aktivity, které je schopno odhalit nárůst i pokles aktivity (tj. základní aktivita změřená zařízením by neměla být tak nízká, aby bylo vyloučeno odhalení poklesů, ani tak vysoká, aby bylo vyloučeno odhalení nárůstu činnosti). Každé zařízení by mělo být otestováno standardními postupy, aby byla v možném rozsahu zajištěna spolehlivost provozu zařízení v příslušné dny. Pokud jde o zařízení, experimentální skupiny by měly být co nejvyváženější. Experimentální skupiny by měly být vyváženě zastoupeny ve zkušebních časech, aby se předešlo zkreslení denním rytmem činnosti.

50. Pokud stávající informace naznačují potřebu dalších funkčních zkoušek (např. smyslových, sociálních, kognitivních), měly by takové zkoušky být zařazeny tak, aby nebyla ohrožena integrita ostatních hodnocení prováděných v rámci studie. Pokud jsou tyto zkoušky prováděny u stejných zvířat, u kterých byly prováděny standardní zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty, hodnocení funkční pozorovací baterie a zkoušky motorické činnosti, měly by být naplánovány jiné zkoušky, aby se minimalizovalo riziko ohrožení integrity těchto zkoušek. Pokud empirické pozorování, předpokládané účinky nebo mechanismus/způsob účinku naznačují specifický typ neurotoxicity, mohou být obzvláště užitečné doplňující postupy.

▼M5

Posouzení potenciální vývojové imunotoxicity (kohorta 3)

51. V PND 56 (± 3 dny) se deset samců a deset samic z kohorty 3 z každé experimentální skupiny (jeden samec nebo jedna samice z vrhu; všechny vrhy zastoupeny nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr) použije v testu protilátkové odezvy závislé na T buňkách, tj. ve zkoušce primární IgM protilátkové odezvy na antigen závislý na T buňkách, jako je např. SRBC test využívající ovčích krvinek nebo test KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) s využitím hemocyaninu mořského členovce *Megathura crenulata*, konzistentní se současnými postupy imunotoxikologických zkoušek (14) (15). Odezvu lze zhodnotit tak, že se spočítají specifické buňky vytvářející plak (PFC, *plaque-forming cells*) na slezině nebo že se určí titr protilátky IgM specifické pro SRBC nebo KLH v séru metodou ELISA při maximální odpovědi. Odpověď zpravidla vrcholí čtyři (počet PFC) nebo pět dní (metoda ELISA) po nitrožilní imunizaci. Pokud je primární protilátková odpověď analyzována spočítáním buněk vytvářejících plak, je přípustné zhodnotit podskupiny zvířat v oddělené dny za předpokladu, že: imunizace a utracení podskupiny jsou načasovány tak, že PFC jsou počítány na vrcholu odpovědi; že podskupiny obsahují stejný počet samčích a samičích potomků ze všech dávkových skupin, včetně kontrolních skupin; a že podskupiny jsou hodnoceny v dobu přibližně stejného postnatálního stáří.Expozice zkoušené chemické látce bude pokračovat až do dne před odběrem slezin pro účely reakce PFC nebo séra pro účely analýzy ELISA.

Následné hodnocení potenciální toxicity pro reprodukci (kohorta 1B)

52. Zvířata z kohorty 1B lze zachovat pro účely aplikace i po PND 90 a lze je chovat s cílem získat v případě potřeby F_2 generaci. Samci a samice z téže dávkové skupiny by měli být páření (přičemž je třeba zamezit páření sourozenců) až po dobu dvou týdnů počínaje po PND 90 nejdéle však do PND 120. Postupuje se podobně jako u zvířat P generace. Avšak na základě posouzení závažnosti důkazů možná postačí, když budou vrhy utraceny v PND 4 a nebudou sledovány až do odstavení nebo ještě déle.

KONEČNÁ POZOROVÁNÍ

Klinická biochemická/hematologická vyšetření

53. U zvířat P generace se sledují systémové účinky. Při utracení jsou deseti náhodně vybraným samcům a samicím P generace z každé dávkové skupiny odebrány nalačno krevní vzorky z definovaného místa, které jsou uloženy za vhodných podmínek a podrobeny částečnému nebo komplexnímu hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, analýze T4 a TSH nebo jiným vyšetřením vyplývajícím z profilu známého účinku zkoušené chemické látky (viz pokyn OECD č. 151 (40)). Zkoumají se tyto hematologické parametry: hematokrity, koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů, počet krevních destiček a srážlivost krve (čas/potenciál). Vyšetření plazmy nebo séra zahrnují: glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinin, celkové bílkoviny, albumin a nejméně dva enzymy ukazující na hepatocelulární účinky (jako např. alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gamma-glutamyltranspeptidáza a sorbitoldehydrogenasa). Za určitých okolností lze získat užitečné informace měřením dalších enzymů a žlučových kyselin. Mimo to lze krev odebrat všem zvířatům a uložit ji pro případnou pozdější analýzu, aby bylo možné vyjasnit nejednoznačné účinky nebo získat údaje o interní expozici. Pokud není zamýšleno druhé

▼M5

páření zvířat P generace, jsou krevní vzorky odebrány těsně před procesem plánovaného utracení nebo v jeho rámci. V případě zachování zvířat se krevní vzorky shromáždí několik dní před druhým pářením zvířat. Pokud existující údaje ze studií s opakovaným podáváním dávek neuvádějí, že daný parametr není zkoušenou chemickou látkou dotčen, provede se analýza moči před utracením a zhodnotí se následující parametry: vzhled, objem, osmolalita nebo hustota, pH, přítomnost bílkovin, glukózy, krve a krvinek, buněčné zbytky. Moč lze také odebrat pro účely monitorování vylučování zkoušené chemické látky a/nebo metabolitu/ů.

54. U zvířat F_1 generace se sledují systémové účinky. Při utracení jsou deseti náhodně vybraným samcům a samicím z kohorty 1 A z každé dávkové skupiny odebrány nalačno krevní vzorky z definovaného místa, které jsou uloženy za vhodných podmínek a podrobeny standardnímu klinickému biochemickému vyšetření, včetně posouzení sérových hladin hormonů štítné žlázy (T4 a TSH), hematologického vyšetření (celkový a diferenciální počet leukocytů a počet erytrocytů) a vyšetření moči.

55. U přebytečných mláďat je v PND 4 provedena celková pitva a je na uvážení, zda provést měření koncentrací hormonu štítné žlázy (T4) v séru. V případě potřeby lze krev novorozených mláďat (PND 4) z jednotlivých vrhů smíchat použít pro biochemické analýzy/analýzy hormonu štítné žlázy. Krev pro analýzu T4 a TSH je také odebrána odstaveným jedincům, u nichž byla v PND 22 provedena celková pitva (mláďata F_1 generace nevybraná do kohort).

Parametry spermatu

56. Parametry spermatu se změří u všech samců P generace, pokud dostupné údaje neukazují, že během devadesátidenní studie parametry spermií nebyly postiženy. Parametry spermií se zkoumají u všech samců z kohorty 1 A.

57. Při ukončení studie je u všech samců P a F_1 generace (kohorta 1 A) zaznamenána hmotnost varlat a nadvarlat. Nejméně jedno varle a jedno nadvarle je vyhrazeno pro histopatologické vyšetření. Zbývající nadvarle se použije ke spočítání zásoby spermií v ocasu nadvarlete (16) (17). Kromě toho se z ocasu nadvarlete (nebo chámovodu) pro účely posouzení motility a morfologie spermií odebere sperma pomocí metod, které minimalizují poškození.

58. Motilitu spermií lze vyhodnotit buď bezprostředně po utracení, nebo lze provést záznam pro pozdější analýzu. Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně pomocí počítačové analýzy pohyblivosti (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pro účely hodnocení morfologie spermií se vzorky epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) vyšetří jako fixované nebo vlhké (25) a (minimálně 200 na vzorek) klasifikují se jako normální (jako normální se jeví hlava i střední část/bičík), nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií zahrnují spojení, izolované hlavičky a zdeformované hlavičky a/nebo bičíky (26). Zdeformované nebo velké hlavičky spermií mohou poukazovat na defekty tvorby spermií.

59. Pokud jsou vzorky spermií při pitvě zmraženy, stěry zakonzervovány a pořízeny obrazové záznamy pro analýzu motility spermií (27), lze následnou analýzu omezit na kontrolní samce a na samce, jimž byly podávány vysoké dávky. Pokud se však zjistí účinky spojené s aplikací, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

▼M5

Celková pitva

60. Po utracení nebo uhynutí během studie jsou všechna zvířata P a F_1 generace podrobena pitvě a vyšetřena makroskopicky na jakékoliv strukturální anomálie anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede záznam o této skutečnosti a vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčiny uhynutí.

61. U samic P a F_1 generace se v den pitvy vyšetří vaginální stěr s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením pohlavních orgánů. Děloha všech samic P generace (a případně F_1) se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

Hmotnost orgánů a uchování tkání – dospělá zvířata P a F_1 generace

62. V okamžiku utracení se u všech zvířat P generace a všech dospělých zvířat F_1 generace z příslušných kohort (jak je uvedeno níže) stanoví tělesná hmotnost a hmotnost dále uvedených orgánů ve vlhkém stavu co nejdříve po pitvě, aby nedošlo k vyschnutí. Tyto orgány se poté uchovají za vhodných podmínek. Není-li stanoveno jinak, párové orgány se mohou zvážit odděleně nebo společně, a sice v souladu s obvyklou praxí dané laboratoře.

— děloha (s vejcovody a děložním hrdlem), vaječníky,

— varlata, nadvarlata (celkem a kaudální část pro vzorky použité ke stanovení počtu spermií),

— prostata (dorzolaterální a ventrální části společně). Při odstraňování celku prostaty je třeba postupovat opatrně, aby nedošlo k propíchnutí semenných váčků naplněných kapalinou. V případě účinku aplikace látky na celkovou hmotnost prostaty by dorzolaterální a ventrální části měly být po fixaci pitvány opatrně a měly by být zváženy samostatně,

— semenné váčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami (jako jedna jednotka),

— mozek, játra, ledviny, slezina, brzlík, hypofýza, štítná žláza (po fixaci), nadledvinky a známé cílové orgány nebo tkáně.

63. Kromě orgánů uvedených výše se za vhodných podmínek uchovají vzorky periferního nervu, svalů, míchy, oka s očním nervem, trávicí soustavy, močového měchýře, plic, průdušnice (s připojenou štítnou žlázou a příštítnými tělísky), kostní dřeně, chámovodu (samci), prsní žlázy (samci a samice) a vaginy.

64. Všechny orgány zvířat kohorty 1 A se zváží a uchovají pro účely histopatologického vyšetření.

65. Pro účely zkoumání prenatálně a postnatálně indukovaných imunotoxických účinků bude deset samců a deset samic z kohorty 1 A z každé exponované skupiny (jeden samec nebo jedna samice z vrhu, všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr) podrobeno při utracení následujícím krokům:

— vážení lymfatických uzlin spojených i nespojených se způsobem expozice (kromě hmotnosti nadledvinek, brzlíku a sleziny již zvážených u všech zvířat z kohorty 1 A),

▼M5

— analýza subpopulace lymfocytů ve slezině (CD4+ a CD8+ T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky) v jedné polovině sleziny, druhá polovina bude uložena pro histopatologické posouzení.

Analýza subpopulací lymfocytů ve slezině u neimunizovaných zvířat (kohorta 1 A) stanoví, zda expozice souvisí se změnou v imunologické rovnovážné distribuci „pomocných“ (CD4+) nebo cytotoxických (CD8+) lymfocytů odvozených z brzlíku nebo NK buněk (rychlé reakce na neoplastické buňky a patogeny).

66. U zvířat kohorty 1 A se zváží následující orgány a odpovídající tkáně se zpracují do stadia bločků:

— vagina (nevážená),

— děloha s děložním hrdlem,

— vaječníky,

— varlata (alespoň jedno),

— nadvarlata,

— semenné váčky a koagulační žlázy,

— prostata,

— hypofýza,

— určené cílové orgány.

V kohortě 1B se provede histopatologické vyšetření, pokud výsledky z kohorty 1 A budou nejednoznačné nebo bude existovat podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty.

67. Kohorty 2a a 2B: zkouška vývojové neurotoxicity (PND 21 nebo PND 22 a dospělé potomstvo). Zvířata kohorty 2 A jsou utracena po zkouškách chování, přičemž je zaznamenána hmotnost mozku a je provedeno kompletní neurohistopatologické vyšetření pro účely neurotoxikologického posouzení. Zvířata kohorty 2B jsou utracena v PND 21 nebo PND 22, přičemž je zaznamenána hmotnost mozku a je provedeno mikroskopické vyšetření mozku pro účely neurotoxikologického posouzení. Perfúzní fixace se provádí povinně u zvířat kohorty 2 A a je volitelná u zvířat kohorty 2B, postup je uveden v metodě B.53 (35).

Hmotnost orgánů a uchování tkání – odstavení potomci generace F_1

68. Mláďata, která nejsou vybrána do kohort, včetně zakrslých mláďat, jsou po odstavení, v PND 22, utracena, pokud z výsledků nevyplývá potřeba dalších vyšetření za života. Utracená mláďata jsou v souladu s odstavci 62 a 63 podrobena celkové pitvě, která zahrnuje posouzení rozmnožovacích orgánů. U maximálně deseti mláďat od každého pohlaví a skupiny, z co největšího počtu vrhů, se váží mozek, slezina a brzlík, které se uchovají za vhodných podmínek. Kromě toho lze pro další mikroskopickou analýzu ([1])(viz pokyn OECD č. 151 (40)) uchovat prsní tkáně těchto mladých samců a samic. Strukturní abnormality a cílové tkáně se uloží pro případné histologické vyšetření.

([1]) Výzkum ukázal, že prsní žláza, zejména v období jejího raného vývoje, je citlivým ukazatelem účinku estrogenu. Doporučuje se, aby do této zkušební metody byly po validaci zahrnuty ukazatele zahrnující prsní žlázy mláďat obou pohlaví.

▼M5

Histopatologická vyšetření – zvířata P generace

69. Je provedeno úplné histologické vyšetření orgánů vyjmenovaných v odstavcích 62 a 63 u všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a kontrolní skupiny P generace. Na pomoc při určování NOAEL by u všech zvířat ze skupin s nižšími dávkami měly být vyšetřeny orgány vykazující změny související s aplikací. Histopatologické vyšetření se navíc provede u rozmnožovacích orgánů všech zvířat, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, oplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií, a u všech tkání s výraznými lézemi.

Histopatologická vyšetření – zvířata F_1 generace

Zvířata kohorty 1

70. U všech dospělých zvířat kohorty 1 A z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou je provedeno celkové histologické vyšetření orgánů vyjmenovaných v odstavcích 62 a 63. Všechny vrhy by měly být zastoupeny nejméně jedním mládětem od každého pohlaví. Na pomoc při určování NOAEL by u všech zvířat ze skupin s nižšími dávkami měly být vyšetřeny orgány a tkáně vykazující změny související s aplikací a všechny tkáně s výraznými lézemi. Pro hodnocení prenatálně a postnatálně indukovaných účinků na lymfatické orgány bude u deseti samců a deseti samic z kohorty 1 A provedeno vedle histopatologického hodnocení brzlíku, sleziny a nadledvinek, které bylo již provedeno u všech zvířat 1 A, také histopatologické vyšetření odebraných lymfatických uzlin a kostní dřeně.

71. V případě podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty by měly být vyšetřeny reproduktivní a endokrinní tkáně všech zvířat kohorty 1B zpracované do stadia bločků, jak je uvedeno v odstavci 66. Zvířata kohorty 1B by také měla být podrobena histologickému vyšetření, pokud jsou výsledky z kohorty 1 A nejednoznačné.

72. Vaječníky dospělých samic by měly obsahovat primordiální a rostoucí folikuly i žlutá tělíska. Z tohoto důvodu by histopatologické vyšetření mělo být zaměřeno na kvantitativní hodnocení primordiálních a malých rostoucích folikulů i žlutých tělísek u samic F_1 generace. Je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječníků a velikost vzorků řezů pro použitý způsob hodnocení. Nejprve může být proveden výpočet počtu folikulů u zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou a v případě nepříznivých účinků by měly být potom hodnoceny i skupiny s nižšími dávkami. Pro porovnání exponovaných a kontrolních vaječníků by měl být zjišťován počet primordiálních folikulů, což může být kombinováno s počítáním malých rostoucích folikulů (viz pokyn OECD č. 151 (40)). Posouzení žlutých tělísek je třeba provést souběžně s hodnocením estrálních cyklů, aby mohlo být při posouzení vzato v úvahu stadium cyklu. Vejcovod, děloha a vagina jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán.

73. U samců F_1 generace jsou provedena podrobná histopatologická vyšetření varlat s cílem identifikovat účinky související s aplikací na diferenciaci a vývoj varlat a na spermatogenezi (38). Pokud je to možné, měly by být vyšetřeny řezy sítí *rete testis*. Hlava, tělo a ocas nadvarlete a chámovod jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán, jakož i z hlediska parametrů požadovaných pro samce P generace.

▼M5

Zvířata kohorty 2

74. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2 A obou pohlaví se po dokončení neurobehaviorálních zkoušek (po PND 75, nejpozději však v PND 90) provede neurohistopatologické vyšetření. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2B obou pohlaví se v PND 21 nebo PND 22 provede histopatologické vyšetření mozku. Orgány nebo tkáně vykazující změny související s aplikací by měly být vyšetřeny u zvířat ze skupin s nižší dávkou s cílem pomoci při určování NOAEL. U zvířat kohorty 2 A a 2B je vyšetřeno více řezů mozku, aby bylo možno vyšetřit čichový bulbus, mozkovou kůru, hippocampus, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek (tectum, tegmentum a pedunculi cerebrales), mozkový kmen a mozeček. Pouze u kohorty 2 A jsou vyšetřeny oči (sítnice a oční nerv) a vzorky periferního nervu, svalu a míchy. Všechny neurohistologické postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).

75. V reprezentativních částech mozku (homologické řezy pečlivě vybrané na základě spolehlivých mikroskopických vývojových znaků) by měla být provedena morfometrická (kvantitativní) hodnocení, která mohou zahrnovat lineární a/nebo plošná měření konkrétních částí mozku. Na každé úrovni by měly být provedeny nejméně tři po sobě jdoucí řezy s cílem vybrat co nejvíce homologní a reprezentativní řez pro konkrétní hodnocenou část mozku. Neuropatolog by měl náležitě posoudit, zda řezy připravené k měření jsou homologní s ostatními v souboru vzorků, a tudíž je vhodné je zahrnout, jelikož zejména lineární měření se mohou v relativně krátké vzdálenosti změnit (28). Neměly by se používat nehomologické řezy. Ačkoli cílem je odebrat vzorky všem zvířatům vyčleněným pro tento účel (10/pohlaví/úroveň dávky), mohou i přesto být adekvátní menší počty. Avšak vzorky od méně než šesti zvířat jednoho pohlaví a jedné dávky by pro účely této zkušební metody nebyly považovány za dostatečné. Pro identifikaci účinků souvisejících s aplikací na parametry, jako je objem nebo počet buněk pro konkrétní neuroanatomické oblasti, lze použít stereologii. Všechny aspekty přípravy vzorků tkání, od fixace tkáně, přes sekci vzorků tkání, zpracování tkání a obarvení preparátů, by měly být vyváženě organizovány tak, aby každá šarže obsahovala reprezentativní vzorky z každé dávkové skupiny. Když mají být provedeny morfometrické nebo stereologické analýzy, pak by měla být mozková tkáň zalita do příslušného média u všech dávkových skupin současně, aby se zamezilo vzniku artefaktů smrštěním, k čemuž dochází v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Údaje

76. Údaje jsou předkládány pro každé jednotlivé zvíře zvlášť a jsou shrnuty ve formě tabulek. Kde je to vhodné, jsou pro každou zkušební skupinu a každou generaci předkládány následující údaje: počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet plodných zvířat, počet březích samic, počet samic s vrhem a počet zvířat vykazujících příznaky toxicity. Měl by být uváděn i popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti.

77. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a uznávanou statistickou metodou. Statistické metody se zvolí jako součást plánu studie a měly by náležitě hodnotit i údaje s jinou než normální distribucí (např. údaje o počtech), ohraničené údaje (např. omezený čas

▼M5

pozorování), závislost proměnných (např. účinky na vrh a opakovaná měření) a rozdílnost rozptylů. Generalizované lineární smíšené modely a modely závislosti účinku na dávce zahrnují širokou skupinu analytických nástrojů, které mohou být vhodné pro údaje vygenerované v rámci této zkušební metody. Zpráva by měla obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu vyhodnotit/znovu vyhodnotit nezávislý posuzovatel/statistik.

Vyhodnocení výsledků

78. Nálezy by měly být vyhodnoceny z hlediska pozorovaných účinků, včetně pitvy a mikroskopických nálezů. Hodnocení zahrnuje vztah, nebo jeho absenci, mezi dávkou a přítomností, frekvencí a závažností anomálií, včetně významných lézí. Posouzeny by měly být též cílové orgány, plodnost, klinické anomálie, reprodukční parametry a parametry vrhu, změny tělesné hmotnosti, mortalita a jakékoli další toxické a vývojové účinky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat změnám u jednotlivých pohlaví. Při hodnocení výsledků zkoušek je třeba brát v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, a jsou-li k dispozici, toxikokinetické údaje, včetně placentárního přenosu a vylučování mléka.

Závěrečná zpráva

79. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto údaje z provedené studie o zvířatech P a F_1 generace, popř. také F_2 generace:

Zkoušená chemická látka:

— veškeré dostupné informace o chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastnostech zkoušené chemické látky,

— identifikační údaje,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý živočišný druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— údaje o vaginálních stěrech u samic P generace před zahájením aplikace (pokud byly stěry v tuto dobu prováděny),

— záznamy o párování zvířat P generace s uvedením samičího a samčího partnera a úspěch páření,

— u dospělých zvířat F_1 generace záznam o vrhu, ze kterého pocházejí.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení aplikační formy zkoušené chemické látky nebo o přípravě směsi s krmivem, o dosažené koncentraci,

▼M5

— stabilita a homogenita přípravku ve vehikulu nebo nosiči (*např.* strava, pitná voda), v krvi a/nebo mléku za podmínek použití a uložení mezi jednotlivými použitími,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené chemické látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně složení krmné směsi, je-li k dispozici),

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění a rozdělení mláďat do zkušebních skupin,

— podmínky prostředí,

— seznam pracovníků provádějících zkoušky, včetně odborného školení.

Výsledky (souhrnné a individuální údaje podle pohlaví a dávky):

— spotřeba potravy, spotřeba vody (je-li k dispozici), využití potravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy, kromě období kohabitace a laktace) a spotřeba zkoušené chemické látky (podle způsobu podávání potravy/pitné vody) u zvířat P a F_1 generace,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat P generace,

— údaje o tělesné hmotnosti u vybraných zvířat F_1 generace po odstavení,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (zda příznaky jsou vratné, či ne),

— údaje o hematologickém vyšetření, vyšetření moči a klinickém chemickém vyšetření včetně TSH a T4,

— fenotypická analýza slezinných buněk (T, B, NK buňky),

— celularita kostní dřeně,

— údaje o toxických reakcích,

— počet samic P a F_1 generace s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— čas do páření (prekoitální interval, počet dnů mezi spárováním a spářením),

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, včetně počtu a procenta zvířat, která se spářila, jsou březí, vrhla a mají laktaci, samců, kteří přivodili březost, samic se známkami dystokie/prodlužovaného nebo ztíženého vrhu,

— trvání březosti, a proběhl-li, údaj o vrhu,

— počty implantovaných plodů, velikost vrhu a procento samčích mláďat,

— počet a procento postimplantačních ztrát, živě a mrtvě narozených mláďat,

▼M5

— údaje o hmotnosti vrhu a hmotnosti mláďat (samci, samice a dohromady), počet zakrslých mláďat, byl-li stanoven,

— počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami,

— toxické nebo jiné účinky na potomstvo, postnatální růst, životaschopnost apod.,

— údaje o fyzických vývojových milnících u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji,

— údaje o pohlavní zralosti zvířat F_1 generace,

— případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u zvířat P generace a dospělých zvířat F_1 generace,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými anomáliemi u samců P a F_1 generace,

— případně počty a maturační stadia folikulů ve vaječnících u samic P a F_1 generace,

— generace výpočet počtu žlutých tělísek ve vaječnících samic F_1 generace,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné.

Parametry kohorty 2:

— Podrobný popis postupů použitých ke standardizaci pozorování a postupů, jakož i definice pro hodnocení s použitím skóre,

— seznam všech použitých zkušebních postupů a odůvodnění jejich použití,

— podrobnosti o behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,

— postupy pro kalibraci a zajištění ekvivalence u těchto zařízení a proporcionálním složení experimentálních skupin při zkušebních postupech,

— krátké odůvodnění vysvětlující jakákoli rozhodnutí zahrnující profesní úsudek,

— podrobný popis všech behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických nálezů ve skupinách podle pohlaví a podle dávky, včetně nárůstu a poklesů u kontrolních skupin,

— hmotnost mozku,

— jakékoli diagnózy odvozené od neurologických známek a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo podmínek,

— optické záznamy typických nálezů,

— optické záznamy s nízkofrekvenčními filtry pro posouzení shodnosti řezů použitých k morfometrii,

▼M5

— statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých k analýze údajů a výsledků bez ohledu na to, zda jsou významné či nikoli,

— význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky, ve skupinách podle pohlaví a podle dávky,

— vliv jakýchkoli toxikokinetických údajů na závěry,

— údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (*tj.* pozitivní a historické kontrolní údaje),

— vztahy, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,

— NOAEL nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a dávkové skupiny,

— diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou neurotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

Parametry kohorty 3:

— titry protilátek IgM v séru (senzibilizace na SRBC nebo KLH) nebo PFC jednotky IgM ve slezině (senzibilizace na SRBC),

— správné provádění metody TDAR by mělo být u laboratoře, která vykonává zkoušku poprvé, prokázáno v procesu optimalizace metody, u všech laboratoří pak pravidelně (např. jednou ročně),

— diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou imunotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

Diskuse o výsledcích

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na rodiče a potomstvo

Měly by být poskytnuty veškeré informace nezískané během studie, ale přínosné pro interpretaci výsledků (např. podobnost účinků jakýchkoli známých neurotoxikantů).

Interpretace výsledků

80. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poskytne v případě potřeby informace o účincích opakované expozice chemické látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčním systému a o vývoji, růstu, přežití a funkčních ukazatelích potomstva do PND 90.

81. Při interpretaci výsledků studie by měly být vzaty v úvahu všechny dostupné informace o chemické látce, včetně fyzikálně-chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastností, dostupné podstatné informace o analogických strukturách a výsledky předchozích studií toxicity se zkoušenou chemickou látkou (např. akutní toxicita, toxicita po opakovaném podání, mechanistické studie a studie posuzující, zda existují podstatné kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi druhy, pokud jde o metabolické procesy *in vivo* a *in vitro*). Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislosti s výsledky zjištěnými v jiných studiích s opakovaným dávkováním. Při zpomalení růstu u potomstva by mohl být brán v úvahu vliv zkoušené chemické látky na složení mléka (29).

▼M5

Kohorta 2 (vývojová neurotoxicita)

82. Výsledky neurobehaviorálních a neuropatologických vyšetření by měly být interpretovány v kontextu všech nálezů s využitím metody posouzení závažnosti důkazů a odborného úsudku. Měly by být prodiskutovány vzorce behaviorálních nebo morfologických nálezů, jsou-li přítomny, jakož i důkazy o závislosti odpovědi na dávce. Do této charakterizace by mělo být zahrnuto hodnocení vývojové neurotoxicity, včetně humánních epidemiologických studií nebo případových zpráv a studií pokusných zvířat (např. toxikokinetické údaje, informace o vztazích mezi strukturou a aktivitou, údaje z jiných studií toxicity). Součástí hodnocení údajů by měla být diskuse biologického i statistického významu. Hodnocení by mělo zahrnovat případný vztah mezi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálními změnami. Pokyny k interpretaci výsledků vyšetření v souvislosti s vývojovou neurotoxicitou odkazují na zkušební metodu B.53 (35) a práci autorů Tyla et al., 2008 (31).

Kohorta 3 (vývojová imunotoxicita)

83. Potlačení nebo podpoření imunitních funkcí vyhodnocené metodou TDAR (protilátková odezva závislá na T buňkách) by mělo být posuzováno v kontextu všech provedených pozorování. Významnost výsledku TDAR může být podpořena jinými účinky na indikátory související s imunitou (např. celularita kostní dřeně, hmotnost a histopatologické vyšetření lymfatických tkání, distribuce podsouborů lymfocytů). Účinky stanovené pomocí TDAR mohou být méně smysluplné v případě jiných toxicit pozorovaných při nižších expozičních koncentracích.

84. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a neurotoxicity by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (26).

LITERATURA

1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼**M5**

8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383–390.

13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼**M5**

23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. s. 319–333.

24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility' *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717–1726.

31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.

34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

35) Kapitola B.53 této přílohy, Studie vývojové neurotoxicity.

36) Kapitola B.54 této přílohy, Uterotrofní biologická zkouška na hlodavcích: Krátkodobá screeningová zkouška estrogenních vlastností.

37) Kapitola B.55 této přílohy, Hershbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.

▼**M5**

38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Dodatek 1

Opatření a pozorování zahrnutá do funkční pozorovací baterie (Kohorta 2 A)

Chovná klec a otevřený prostor	Manipulační	Fyziologická
Poloha	Snadnost přemístění	Teplota
Nedobrovolné klonické a tonické pohyby	Snadnost manipulace	Tělesná hmotnost
Srostlá víčka	Svalový tonus	Reakce zorniček
Naježení chlupů	Reakce při přiblížení	Velikost zorniček
Tvorba slin	Reakce na dotyk	
Tvorba slz	Reakce na zvukový podnět	
Vydávání zvuků	Reakce na sevření ocasu	
Odchov	Vzpřimovací reakce	
Anomálie chůze	Roztažení zadních nohou při pádu z výšky	
Vzrušení	Síla úchopu předních končetin	
Stereotypy v chování	Síla úchopu zadních končetin	
Zvláštní chování		
Skvrny		
Respirační anomálie		

▼**M5**

Dodatek 2

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M5

B.57 ZKOUŠKA STEROIDOGENEZE H295R

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení (TG) 456 (2011). V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. Koncepční rámec OECD z roku 2002 pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti (1). Zkouška steroidogeneze *in vitro* H295R (zkouška H295R) popsaná v této zkušební metodě využívá lidskou buněčnou linii adrenálního karcinomu (buňky NCI-H295R) a představuje úroveň 2 koncepčního rámce: „zkoušky *in vitro* poskytující mechanistické údaje‘ pro účely screeningu a stanovení priorit. Vývoj a standardizace zkoušky jako screeningu pro chemické účinky na steroidogenezi, konkrétně na produkci estradiolu (E2) a testosteronu (T), proběhly formou vícestupňového procesu. Zkouška H295R byla optimalizována a validována (2) (3) (4) (5).

2. Cílem zkoušky steroidogeneze H295R je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci hormonů E2 a T. Cílem zkoušky H295R je identifikovat xenobiotika, která mají jako své cílové místo, případně cílová místa, endogenní složky, které zahrnují nitrobuněčnou biochemickou dráhu začínající řadou reakcí počínaje cholesterolem až po produkci E2 a/nebo T. Účelem zkoušky H295R není identifikovat chemické látky, které mají vliv na steroidogenezi z důvodu účinků na osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG). Cílem zkoušky je poskytnout odpověď ANO/NE, pokud jde o potenciál chemické látky vyvolávat nebo tlumit produkci hormonů T a E2. V některých případech však mohou být získány kvantitativní výsledky (viz odstavce 53 a 54). Výsledky zkoušky jsou vyjádřeny jako relativní změny v produkci hormonu v porovnání s kontrolami pomocí rozpouštědel (SC). Účelem zkoušky není poskytnout specifické mechanistické informace týkající se interakce zkoušené chemické látky s endokrinním systémem. Proběhly výzkumy, které používaly tuto buněčnou linii k identifikaci účinků na specifické enzymy a meziproduktové hormony, např. progesteron (2).

3. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku. Podrobný pracovní postup včetně pokynů, jak připravit roztoky, kultivovat buňky a provádět různé aspekty zkoušek, je k dispozici v dodatku I–III dokumentu OECD ‘Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production’ (4).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Biosyntézy pohlavních steroidních hormonů se účastní pět různých enzymů, které působí jako katalyzátor v šesti různých reakcích. Enzymatická konverze cholesterolu na pregnenolon cytochromem P450 (CYP), konkrétně štěpením cholesterolového bočního řetězce enzymem CYP11 A, představuje úvodní krok v sérii biochemických reakcí, které vrcholí syntézou steroidních konečných produktů. V závislosti na pořadí dalších dvou reakcí se steroidogenní dráha rozdvojí, na Δ^5-hydroxysteroidní dráhu a Δ^4-ketosteroidní dráhu, které se sbíhají v produkci androstendionu (obrázek 1).

5. Androstendion se přeměňuje na testosteron (T) působením 17β-hydroxysteroid dehydrogenasou (17β-HSD). Testosteron je meziprodukt i konečný produkt/hormon. V mužském těle se T může přeměnit na dihydrotestosteron (DHT) díky 5α-reduktáze, která se nachází v buněčných membránách, jaderném obalu a endoplazmatickém retikulu cílových tkání androgenního působení, např. v prostatě a semenných váčcích. DHT je jako androgen výrazně účinnější než T a je též považován za konečný hormon. Zkouška H295R nedetekuje DHT (viz odstavec 10).

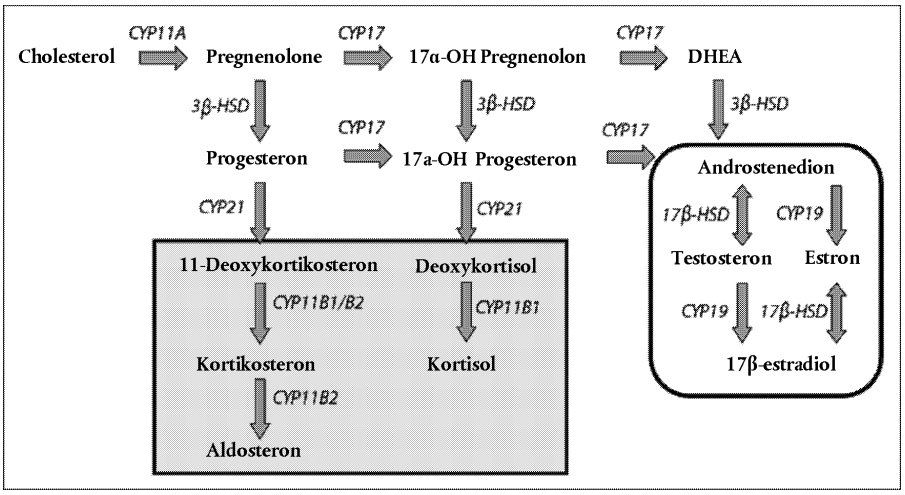
▼M5

6. Enzym na steroidogenní dráze, který přeměňuje androgenní chemické látky na estrogenní chemické látky, je aromatáza (CYP19). CYP19 přeměňuje T na 17β-estradiol (E2) a androstendion na estron. E2 a T jsou považovány za konečné hormony steroidogenní dráhy.

7. Specifičnost činnosti lyázy CYP17 se mezi druhy liší z hlediska intermediálních substrátů. U lidí enzym upřednostňuje substráty Δ^5-hydroxysteroidní dráhy (pregnenolon), zatímco substráty na Δ^4-ketosteroidní dráze (progesteron) jsou upřednostňovány u potkanů (19). Takové rozdíly v činnosti lyázy CYP17 mohou vysvětlovat některé rozdíly závislé na daném živočišné druhu v reakci na chemické látky, které mění steroidogenezi *in vivo* (6). Bylo prokázáno, že buňky H295 nejblíže odrážejí expresi adrenálního enzymu a vzorec produkce steroidů u dospělých osob (20), ale je známo, že zajišťují expresi enzymů jak pro Δ^5-hydroxysteroidní, tak pro Δ^4-ketosteroidní dráhu androgenní syntézy (7) (11) (13) (15).

Obrázek 1

Steroidogenní dráha v buňkách H295R



Poznámka:

Enzymy jsou psány kurzivou, hormony jsou psány tučně a šipky značí směr syntézy. Šedé pozadí značí kortikosteroidní dráhy/produkty. Dráhy/produkty pohlavních steroidů jsou v bílém poli. CYP = cytochrom P450; HSD = hydroxysteroidní dehydrogenasa; DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Lidská buněčná linie adrenálního karcinomu H295R je užitečným modelem *in vitro* pro zkoumání účinků na syntézu steroidních hormonů (2) (7) (8) (9) (10). Buněčná linie H295R má exprimovány geny, které kódují všechny klíčové enzymy pro steroidogenezi uvedenou výše (11) (15) (obrázek 1). To je jedinečná vlastnost, protože exprese těchto genů *in vivo* je specifická z hlediska tkáně a vývojového stadia, přičemž zpravidla žádná tkáň ani žádné vývojové stadium neexprimuje všechny geny účastnící se steroidogeneze (2). Buňky H295R mají fyziologické charakteristiky zonálně nediferencovaných adrenálních buněk lidského plodu (11). Tyto buňky představují jedinečný systém *in vitro v* tom, že mají schopnost produkovat veškeré steroidní hormony, které se nacházejí v kůře nadledvin a v pohlavních žlázách, což umožňuje provést zkoušky jak účinků na kortikosteroidovou syntézu, tak účinků na produkci pohlavních steroidních hormonů, jako jsou

▼M5

androgeny a estrogeny, ačkoli zkouška byla validována pouze pro detekci hormonů T a E2. Změny, které tento zkušební systém zaznamenává ve formě změn v produkci T a E2, mohou být výsledkem velkého množství různých interakcí zkoušených chemických látek se steroidogenními funkcemi, které probíhají v buňkách H295R. Patří mezi ně modulace exprese, syntézy nebo funkce enzymů, které se účastní produkce, přeměny nebo eliminace steroidních hormonů (12) (13) (14). Inhibice produkce hormonů může být způsobena přímou kompetitivní vazbou na enzym v této dráze účinkem na kofaktory jako jsou NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), a/nebo zvýšením metabolismu steroidů nebo potlačením genové exprese určitých enzymů v dráze steroidogeneze. Zatímco inhibice může být funkcí jak přímých, tak nepřímých procesů účastnících se produkce hormonů, indukce má zpravidla nepřímý charakter, například ovlivňuje kofaktory, jako jsou NADPH a cAMP (stejně jako v případě forskolinu), snižuje metabolismus steroidů (13) a/nebo zvyšuje steroidogenní genovou expresi.

9. Zkouška H295R má několik výhod:

— umožňuje odhalení nárůstů i poklesů v produkci T i E2,

— dovoluje přímé zhodnocení případného vlivu chemické látky na buněčnou životaschopnost/cytotoxicitu. To je důležitá vlastnost, protože umožňuje rozlišení účinků, které jsou vyvolány cytotoxicitou, a účinků, které jsou vyvolány přímou interakcí chemických látek se steroidogenními drahami, což není možné v systémech tkáňových explantátů, které jsou tvořeny mnoha buněčnými typy s proměnlivou citlivostí a funkčností,

— není nutné využívat zvířata,

— buněčná linie H295R je komerčně dodávána.

10. Základní omezení zkoušky jsou následující:

— Není známa její metabolická schopnost, ale pravděpodobně je dost omezená; chemické látky, které musí být metabolicky aktivovány, pravděpodobně nebudou v této zkoušce zachyceny.

— Jelikož je H295R získávána z tkáně nadledvin, obsahuje enzymy schopné produkovat gluko- a mineralokortikoidy, stejně jako pohlavní hormony. Z tohoto důvodu by účinky na produkci gluko- a mineralokortikoidů mohly ovlivnit úrovně hormonů T a E2 pozorované ve zkoušce.

— Neměří DHT, a tudíž se neočekává, že by při ní byly odhaleny chemické látky, které inhibují 5α-reduktázu. V takovém případě lze použít Hershbergerovu zkoušku (16).

— Zkouška H295R neodhalí chemické látky, které zasahují do steroidogeneze tím, že postihují osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG), protože tu lze studovat pouze u zvířat *in vivo*.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Účelem této zkoušky je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci T a E2. T je také meziproduktem na dráze k produkci E2. Zkouška může odhalit chemické látky, které zpravidla inhibují anebo indukují enzymy dráhy steroidogeneze.

▼M5

12. Zkouška se obvykle provádí za standardních podmínek kultivace buněk v 24jamkových kultivačních destičkách. Případně lze k provedení zkoušky použít jiné velikosti destiček. Nasazení buněk a experimentální podmínky by však měly být podle toho upraveny tak, aby byl zachován soulad s kritérii provedení testu.

13. Po aklimatizačním období v délce 24 hodin ve vícejamkových destičkách jsou buňky po dobu 48 hodin vystaveny sedmi koncentracím zkoušené chemické látky, alespoň ve třech souběžných experimentech/opakováních. Rozpouštědlo a známý inhibitor a induktor produkce hormonů v určené koncentraci jsou použity jako negativní a pozitivní kontroly. Na konci období expozice je médium ze všech jamek odstraněno. Bezprostředně po odstranění média je analyzována životaschopnost buněk v každé jamce. Koncentrace hormonů v médiu lze měřit pomocí celé řady metod včetně komerčně dostupných sad k měření hormonů a/nebo přístrojových technik, jako je kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Údaje jsou vyjádřeny jako násobná změna vztažená k negativní kontrole (rozpouštědlo) a jako nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou pozorovány účinky (*Lowest-Observed-Effect-Concentration*, LOEC). Je-li zkouška negativní, je nejvyšší testovaná koncentrace označena jako nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (*No-Observed-Effect-Concentration*, NOEC). Závěry týkající se schopnosti chemické látky ovlivnit steroidogenezi by měly vycházet nejméně ze dvou nezávislých pokusů. První pokus může fungovat jako pokus zjišťující rozmezí dávek případně s následnou úpravou koncentrací pro pokusy 2 a 3, pokud se objeví problémy s rozpustností nebo cytotoxicitou nebo pokud se zdá, že aktivita chemické látky je na hranici rozpětí zkoušených koncentrací.

KULTIVACE

Buněčná linie

14. Buňky NCI-H295R lze komerčně získat z *American Type Culture Collections* (ATCC) po podpisu smlouvy o prodeji materiálu (*Material Transfer Agreement*, MTA) ([1]).

Úvod

15. Z důvodu změn schopnosti buněk produkovat E2 se zvyšujícím se stářím/počtem pasáží (2) by kultivace buněk měla před jejich použitím probíhat v souladu s konkrétním pracovním postupem a měl by být zaznamenán počet pasáží od rozmrazení buněk i číslo/pořadí pasáže, v níž byly buňky zmraženy a umístěny do kapalného dusíku. První číslo uvádí skutečný počet buněčných pasáží a druhé číslo popisuje číslo pasáže, v níž byly buňky zmraženy a uloženy. Například buňky, které byly zmraženy po pasáži pět a rozmraženy a poté byly třikrát rozděleny (čtyři pasáže počítající čerstvě rozmražené buňky se počítají jako pasáž 1) by poté, co byly opět kultivovány, byly označeny jako pasáž 4,5. Příklad schématu číslování je uveden v dodatku I validační zprávy (4).

16. Jako základ pro obohacené médium a mrazicí médium se použije zásobní médium. Obohacené médium je nezbytnou součástí kultivace buněk. Mrazicí médium je speciálně navrženo tak, aby umožnilo ničím nedotčené zmrazení buněk pro dlouhodobé skladování. Před použitím by z hlediska základních koncentrací T a E2 měla proběhnout analýza Nu-séra (nebo srovnatelného séra se stejnými vlastnostmi, kde bylo prokázáno, že splňuje požadavky na provedení zkoušky a kontrolu kvality), které je součástí obohaceného média. Příprava těchto roztoků je popsána v dodatku II validační zprávy (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Po zahájení kultivace buněk H295R z původní dodávky z ATCC by buňky měly růst po pět pasáží (tj. buňky jsou rozděleny čtyřikrát). Buňky pasáže 5 jsou poté zmraženy v kapalném dusíku a uskladněny. Před zmrazením buněk je na destičce pro kontrolu kvality (QC-destičce) odebrán vzorek buněk předchozí pasáže 4 (viz odstavec 36 a 37), aby se ověřilo, zda bazální produkce hormonů a reakce pozitivní kontrolní látky splňují kritéria kontroly kvality zkoušky definovaná v tabulce 5.

18. Buňky H295R musí být kultivovány, zmraženy a uchovávány v kapalném dusíku, aby bylo zajištěno, že pro účely kultivace a použití budou vždy k dispozici buňky příslušné pasáže/stáří. Aby to bylo přijatelné pro zkoušku H295R, tak pasáží po odebrání nové ([1]) nebo zmrazené ([2]) dodávky buněk do kultury by nemělo být více než deset. Například přijatelné pasáže pro kultury buněk z dávky zmrazené v pasáži 5 by byly 4,5 až 10,5. U buněk kultivovaných z těchto zmrazených dávek by měl být dodržen postup popsaný v odstavci 19. Tyto buňky by se měly před použitím kultivovat alespoň čtyři (4) další pasáže (pasáž 4,5).

Aktivace buněk ze zmrazené zásoby

19. Postup pro aktivaci buněk ze zmrazené zásoby se uplatňuje tehdy, když se z uskladnění v kapalném dusíku vyjme pro účely kultivace a zkoušení nová dávka buněk. Podrobnosti o tomto postupu jsou stanoveny v dodatku III validační zprávy (4). Buňky jsou vyjmuty ze skladovacích nádob s kapalným dusíkem, rychle jsou rozmraženy, umístěny do obohaceného média v centrifugační zkumavce, odstředěny při pokojové teplotě, opětovně suspendovány v obohaceném médiu a přeneseny do kultivační baňky. Médium by mělo být následující den vyměněno. Buňky H295R se kultivují v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % CO_2 ve vzduchové atmosféře a médium se obnovuje 2–3krát týdně. Jakmile buňky dosáhnou konfluence přibližně 85–90 %, měly by být rozděleny. Rozdělení buněk je nezbytné pro zajištění zdraví a růstu buněk a pro zachování buněk pro účely provádění biologických zkoušek. Buňky jsou třikrát opláchnuty ve fyziologickém roztoku ve fosfátovém pufru (PBS, bez Ca^{2+} Mg^{2+}) a vyňaty z kultivační baňky přidáním vhodného odlučovacího enzymu, např. trypsinu, do PBS (bez Ca^{2+} Mg^{2+}). Bezprostředně po vynětí buněk z kultivační baňky by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrifugační zkumavky, odstředěny při pokojové teplotě, je odstraněn supernatant a sediment buněk se resuspenduje v obohaceném médiu. Příslušné množství buněčné suspenze se umístí do nové kultivační baňky. Toto množství buněčné suspenze by se mělo upravit tak, aby buňky dosáhly do 5–7 dnů konfluence. Doporučený subkultivační poměr je 1:3 až 1:4. Destička by měla být pečlivě označena. Buňky jsou nyní připraveny k použití při zkoušce a přebytečné buňky by měly být podle odstavce 20 zmraženy v kapalném dusíku.

([1]) „Novou dávkou“ se rozumí čerstvá dávka buněk obdržená od ATCC.

([2]) „Zmrazenou dávkou“ se rozumí buňky, které byly dříve kultivovány a poté zmrazeny v jiné laboratoři, než je ATCC.

▼M5

Zmrazení buněk H295R (příprava buněk na skladování v kapalném dusíku)

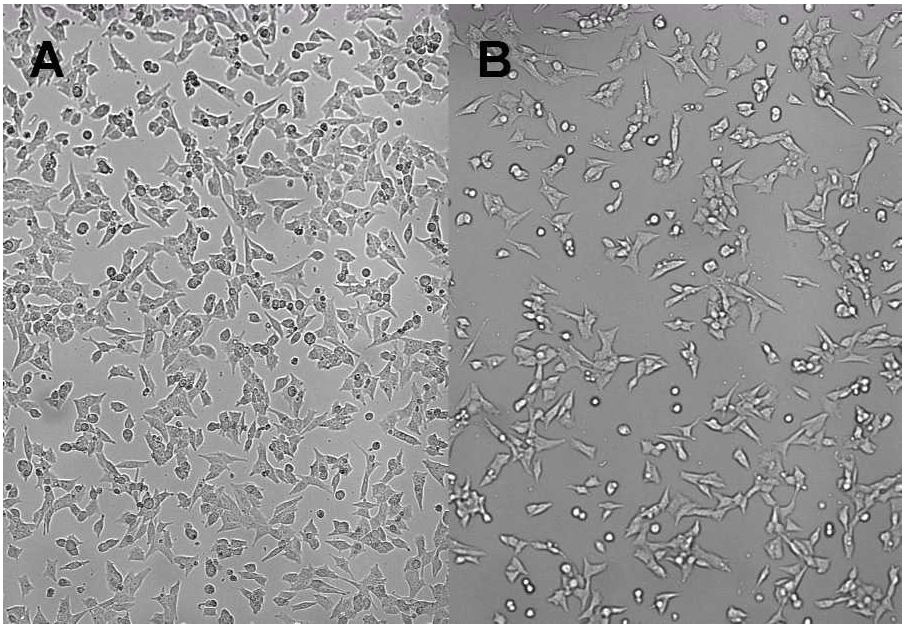
20. Pro přípravu buněk H295R na zmrazení je zapotřebí dodržet postup popsaný výše u dělení buněk až do kroku resuspenze sedimentu buněk na dně odstředivkové zkumavky. Zde je sediment buněk resuspendován v mrazicím médiu. Roztok je přenesen do řádně označené kryogenní ampulky a zmražen při teplotě – 80 °C na 24 hodin, po jejichž uplynutí je kryogenní ampulka přemístěna do kapalného dusíku k uskladnění. Podrobnosti o tomto postupu jsou stanoveny v dodatku III validační zprávy (4).

Umístění buněk na destičky a preinkubace před zkoušením

21. Počet 24jamkových destiček připravených podle odstavce 19, které budou zapotřebí, závisí na počtu zkoušených chemických látek a konfluenci buněk v kultivačních miskách. Zpravidla jedna kultivační baňka (75 cm^2) buněk s 80–90 % konfluencí zajistí dostatečné množství buněk pro 1–1,5 (24jamkové) destičky při cílové hustotě 200 000 až 300 000 buněk na 1 ml média s výslednou přibližnou 50–60 % konfluencí v jamkách během 24 hodin (obrázek 2). To je obvykle optimální hustota buněk pro produkci hormonu při zkoušce. Při vyšších hustotách se vzorce produkce T i E2 mění. Před prvním provedením zkoušky se doporučuje vyzkoušet různé hustoty nasazení mezi 200 000 a 300 000 buňkami na 1 ml a pro další pokusy vybrat hustotu, která během 24 hodin přinese 50–60 % konfluenci v jamce.

Obrázek 2

Mikrosnímek buněk H295R při 50 % hustotě nasazení v 24jamkové kultivační destičce po 24 hodinách pořízený na okraji (A) a ve středu (B) jamky



22. Médium je rozpipetováno z kultivační baňky a buňky jsou třikrát propláchnuty sterilním PBS (bez $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Je přidán roztok enzymu (v PBS) pro oddělení buněk od kultivační baňky. Po uplynutí náležité doby pro oddělení buněk by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrigugační zkumavky, odstředěny při pokojové teplotě, odstraní se supernatant a sediment buněk se resuspenduje

▼M5

v obohaceném médiu. Hustota buněk se vypočítá např. pomocí hemocytometru nebo počítače buněk. Buněčná suspenze by měla být zředěna na požadovanou hustotu pro destičku a důkladně rozmíchána, aby byla zajištěna homogenní hustota buněk. Buňky by měly být umístěny na destičky s 1 ml buněčné suspenze na jamku a destičky a jamky by měly být označeny. Destičky s nasazenými buňkami se inkubují při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO_2 na dobu 24 hodin, aby se buňky mohly přichytit k jamkám.

POŽADAVKY KONTROLY KVALITY

23. Je velmi důležité, aby během dávkování byl do jamek umístěn přesný objem roztoků a vzorků, protože tento objem určuje koncentrace používané při počítání výsledků zkoušky.

24. Před zahájením kultivace buněk a jakýmkoli následným zkoušením by každá laboratoř měla doložit citlivost svého systému měření hormonů (odstavce 29–31).

25. Používají-li se zkoušky měření hormonu na základě protilátek, musí být před zahájením zkoušení provedena analýza zkoušených chemických látek, aby se zjistilo, zda mají potenciál působit rušivě na systém měření používaný ke kvantifikaci T a E2 podle odstavce 32.

26. Doporučovaným rozpouštědlem pro zkoušku je DMSO. Pokud se používá alternativní rozpouštědlo, je zapotřebí stanovit toto:

— rozpustnost zkoušené chemické látky, forskolinu a prochlorazu v rozpouštědle, a

— cytotoxicitu jako funkci koncentrace rozpouštědla.

Doporučuje se, aby maximální přípustná koncentrace rozpouštědla nepřekročila desetinásobek zředění nejmenší cytotoxické koncentrace rozpouštědla.

27. Před prvním provedením zkoušky by laboratoř měla provést kvalifikační pokus prokazující, že laboratoř je schopna udržet a dosáhnout vhodných kultivačních a experimentálních podmínek, které jsou požadovány pro zkoušení chemické látky podle odstavců 33–35.

28. Na začátku zkoušení při použití nové dávky buněk by před použitím nové dávky buněk ke zkoušení měl být proveden kontrolní experiment (destička pro kontrolu kvality – *QC plate*) ke zhodnocení vlastností buněk podle odstavců 36 a 37.

Fungování systému měření hormonů

Citlivost metody, přesnost, preciznost a křížová reaktivita s matricí vzorků

29. Každá laboratoř může k analýze produkce T a E2 buňkami H259R používat systém měření hormonů dle své volby, pokud splňuje kritéria provedení zkoušky, včetně meze kvantifikace (LOQ). Nominálně to je 100 pg/ml pro T a 10 pg/ml pro E2, které vycházejí z bazálních hladin hormonů pozorovaných ve validačních studiích. Avšak v závislosti na bazálních hladinách hormonů dosažených v provádějící laboratoři mohou být vhodné vyšší nebo nižší hladiny. Před zahájením pokusů s destičkou pro kontrolu kvality a pokusů v rámci zkoušky by laboratoř měla prokázat, že při uplatněné zkoušce hormonů lze změřit koncentrace hormonů v obohaceném médiu s dostatečnou přesností a precizností, aby mohla být při analýze obohaceného média doplněné o interní kontrolu hormonů splněna kritéria

▼M5

kontroly kvality specifikovaná v tabulkách 1 a 5. Obohacené médium by mělo být doplněno nejméně o tři koncentrace každého hormonu (např. 100, 500 a 2 500 pg/ml hormonu T; 10, 50 a 250 pg/ml hormonu E2; nebo pro nejnižší obohacené koncentrace T a E2 lze použít nejnižší možné koncentrace na základě limitů zjištění vybraného systému měření hormonů) a analyzováno. Naměřené koncentrace hormonů u neextrahovaných vzorků by měly spadat do rozmezí 30 % nominálních koncentrací a rozdíl mezi opakovanými měřeními téhož vzorku by neměl překročit 25 % (viz rovněž tabulka 8, kde jsou uvedena další kritéria kontroly kvality). Pokud jsou tato kritéria kontroly kvality splněna, předpokládá se, že vybraná metoda měření hormonů je dostatečně přesná, precizní a nedochází při ní ke křížové reakci se složkami média (matrice vzorků), tak, že by se očekával významný vliv na výsledek zkoušky. V tomto případě není vyžadována extrakce vzorků před měřením hormonů.

30. V případě, že kritéria kontroly kvality v tabulkách 1 a 8 nejsou splněna, může se objevit významný účinek matrice a měl by být proveden pokus s extrahovaným obohaceným médiem. Příklad postupu extrakce je popsán v dodatku II validační zprávy (4). Měření koncentrací hormonů v extrahovaných vzorcích by měla být provedena trojmo. ([1]) Pokud lze dokázat, že po extrakci nenarušují složky média metodu zjišťování hormonů podle kritérií kontroly kvality, měly by být všechny další pokusy uskutečněny pomocí extrahovaných vzorků. Pokud kritéria kontroly kvality nelze po extrakci splnit, použitý systém měření hormonů není pro účely zkoušky steroidogeneze H295R vhodný a měla by se použít alternativní metoda zjišťování hormonů.

Standardní křivka

31. Koncentrace hormonů v kontrolních vzorcích rozpouštědla by měly být v rozmezí lineární části standardní křivky. V ideálním případě by se hodnoty kontrolních vzorků rozpouštědla měly pohybovat kolem středu lineární části, aby bylo zajištěno, že bude možné změřit indukci a inhibici syntézy hormonů. Podle toho je třeba vybrat zředění média (nebo extrakty), které budou měřeny. Lineární vztah se stanoví vhodným statistickým přístupem.

Zkouška interference chemické látky

32. Pokud se k měření hormonů použijí metody založené na protilátkách, jako jsou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) a radio-imunoanalýzy (RIA), měla by být každá chemická látka otestována z hlediska potenciální interference se systémem měření hormonů, který bude použit, a to ještě před zahájením vlastního zkoušení chemických látek (dodatek III validační zprávy (4)), protože některé chemické látky mohou s těmito zkouškami interferovat (17). Dochází-li k interferenci, která je ≥ 20 % bazální produkce hormonů pro T a/nebo E2, jak stanoví analýza hormonů, měl by u všech ředění zásobního roztoku zkoušené chemické látky proběhnout test interference chemické látky s hormony při zkoušce (např. jak je popsáno v dodatku III validační zprávy (4) oddílu 5.0) s cílem určit prahovou dávku, při níž

([1]) *Pozn.:* Je-li požadována extrakce, jsou pro každý extrakt provedena tři opakovaná měření. Každý vzorek bude extrahován pouze jednou.

▼M5

dochází k významné interferenci (≥ 20 %). Pokud je interference menší než 30 %, výsledky lze opravit. Pokud interference přesáhne 30 %, údaje jsou neplatné a údaje pro tyto koncentrace by měly být odstraněny. Pokud při více než jedné necytotoxické koncentraci dochází k významné interferenci zkoušené chemické látky se systémem měření hormonů, měl by se použít jiný systém měření hormonů. Aby se předešlo interferenci s kontaminujícími chemickými látkami, je doporučeno, aby hormony byly z média extrahovány pomocí vhodného rozpouštědla. Možné metody lze najít ve validační zprávě (4).

Tabulka 1

Kritéria provedení pro systémy měření hormonů

Parametr	Kritérium
Citlivost metody měření	Mez kvantifikace (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Účinnost extrakce hormonů (pouze pokud je extrakce nutná)	Průměrné podíly výtěžnosti (na základě tří měření) u standardního přídavku hormonu by se neměly odchylovat od množství, které bylo přidáno, o více než 30 %.
Interference chemické látky (pouze systémy na základě protilátek)	Nemělo by docházet k žádné podstatné (≥ 30 % bazální produkce příslušného hormonu) křížové reaktivitě s kterýmkoli z hormonů produkovaných buňkami [b] [c]

[a] *Poznámka:* Limity metody měření vycházejí z hodnot bazální produkce hormonů uvedených v tabulce 5 a opírají se o provedení. Pokud lze dosáhnout vyšší bazální produkce hormonů, může být limit vyšší.

[b] Některé protilátky T a E2 mohou při vyšším procentu křížově reagovat s androstendionem, resp. estronem. V takových případech nelze přesně určit účinky na 17β-HSD. Údaje však i přesto mohou poskytnout užitečné informace týkající se účinků na produkci estrogenu nebo androgenu obecně. V takových případech by údaje měly být vyjádřeny spíše jako odpovědi na androgen/estrogen než E2 a T.

[c] Patří mezi ně: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxykortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon,17α-progesteron, deoxykortizol, kortizol, DHEA, androstendion, estron.

Test způsobilosti laboratoře

33. Před zkoušením neznámých chemických látek by laboratoř měla provedením testu způsobilosti prokázat, že je schopna dosáhnout náležitých podmínek pro kultivaci buněk a zkušebních podmínek, které jsou požadovány pro úspěšné provedení zkoušky, a udržet je. Jelikož uskutečnění zkoušky je přímo spojeno s pracovníky laboratoře, kteří budou danou zkoušku provádět, měly by být tyto postupy částečně zopakovány, pokud dojde ke změně laboratorního personálu.

34. Tento test způsobilosti bude uskutečněn za podmínek uvedených v odstavcích 38 až 40 tak, že buňky budou vystaveny sedmi rostoucím koncentracím silných, mírných a slabých induktorů a inhibitorů, jakož i negativní chemické látce (viz tabulka 2). Mezi chemické látky, které mají být zkoušeny, patří konkrétně silný induktor forskolin (č. CAS 66575-29-9), silný inhibitor prochloraz (č. CAS 67747-09-5), mírný

▼M5

induktor atrazin (č. CAS 1912-24-9), mírný inhibitor aminoglutethimid (č. CAS 125-84-8), slabý induktor (produkce E2) a slabý inhibitor (produkce T) bisfenol A (č. CAS 80-05-7) a negativní chemická látka choriogonadotropin (HCG) (č. CAS 9002-61-3) (viz tabulka 2). Pomocí formátu podle tabulky 6 jsou všechny chemické látky umísťovány do oddělených destiček. U chemických látek pro test způsobilosti by měla být v každém dnu zkoušení zařazena jedna QC-destička (tabulka 4, odstavce 36–37).

Tabulka 2

Chemické látky pro test způsobilosti a expoziční koncentrace

Chemická látka pro test způsobilosti	Expoziční koncentrace [μM]
Prochloraz	0 ([a]); 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolin	0 ([a]); 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30
Atrazin	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutethimid	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenol A	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
HCG	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100

([a]) Kontrola rozpouštědla (DMSO) (0), 1 μl DMSO/jamka.

Při testu způsobilosti laboratoře by expozice buněk H295R chemickým látkám měla proběhnout v 24jamkových destičkách. U všech dávek zkoušených chemických látek se dávky stanovují v μM. Dávky by se měly podávat v DMSO při 0,1 % obj. na jamku. Všechny zkoušené koncentrace by měly být testovány ve třech jamkách (tabulka 6). Pro každou chemickou látku se používají oddělené destičky. V každém dnu zkoušení se zařadí jedna QC-destička.

35. Analýzy životaschopnosti buněk a hormonů by měly být provedeny v souladu s odstavci 42 až 46. Měly by být oznámeny prahová hodnota (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky, LOEC) a rozhodnutí o klasifikaci a měly by být porovnány s hodnotami v tabulce 3. Údaje jsou považovány za přijatelné, pokud splňují LOEC a klasifikaci v tabulce 3.

Tabulka 3

Prahové hodnoty (LOEC) a klasifikace výsledku pro chemické látky v testu způsobilosti

	Číslo CAS	LOEC [μM]		Klasifikace výsledku	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inhibice)	+ (Inhibice)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Aminoglute-thimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibice)	+ (Inhibice)

▼M5

	Číslo CAS	LOEC [μM]		Klasifikace výsledku	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibice)	+ (Indukce)
HCG	9002-61-3	nepou-žije se	nepou-žije se	negativní	negativní

([a]) +, pozitivní
nepoužije se – vzhledem k tomu, že po expozici necytotoxickým koncentracím negativní kontroly by nemělo dojít k žádným změnám.

Destička pro kontrolu kvality (*Quality Control Plate*), QC-destička

36. QC-destička se používá k ověření chování buněk H295R za standardních podmínek kultivace a k vytvoření dosavadní databáze koncentrací hormonů při kontrolách rozpouštědel, pozitivních a negativních kontrolách a při jiných opatřeních kontroly kvality v průběhu času.

— Chování buněk H295R by mělo být posuzováno pomocí QC-destičky pro každou novou dávku ATCC nebo po prvním použití dříve zmrazené zásoby buněk, pokud test způsobilosti laboratoře (odstavce 32–34) proběhl s touto dávkou buněk.

— QC-destička zajišťuje kompletní posouzení podmínek zkoušky (např. životaschopnost buněk, kontroly rozpouštědel, negativní a pozitivní kontroly, jakož i rozdíly v rámci zkoušky a mezi zkouškami) při zkoušení chemických látek a měla by být součástí každé zkoušky.

37. Test kontroly kvality se provádí v 24jamkové destičce a probíhá stejnými postupy inkubace, dávkování, životaschopnosti buněk/cytotoxicity, extrakce hormonů a analýzy hormonů, které jsou popsány v odstavcích 38 až 46 pro zkoušení chemických látek. QC-destička obsahuje slepé pokusy, kontroly rozpouštědla a dvě koncentrace známého induktoru (forskolin, 1, 10 μM) a inhibitoru (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntézy E2 a T. Kromě toho se ve vybraných jamkách používá jako pozitivní kontrola pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity MeOH. Podrobný popis rozvržení destičky obsahuje tabulka 4. Kritéria, která musí QC-destička splňovat, jsou vyjmenována v tabulce 5. Minimální bazální produkce hormonu u T a E2 by měla být splněna jak při kontrole rozpouštědla, tak v jamkách pro slepé pokusy.

Tabulka 4

Rozvržení QC-destičky pro zkoušení chování buněk H295R nevystavených expozici a buněk vystavených expozici známých inhibitorů (PRO = prochloraz) a stimulantů (FOR = forskolin) produkce E2 a T. Po ukončení pokusu s expozicí a odstranění média bude do všech jamek s MeOH přidán 70 % roztok metanolu, který poslouží jako pozitivní kontrola cytotoxicity (viz zkouška cytotoxicity v dodatku III validační zprávy (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Buňky v jamkách pro slepý pokus dostanou pouze médium (tj. žádné rozpouštědlo).
([b]) Metanol (MeOH) bude přidán **až po** ukončení expozice a odstranění média z těchto jamek.
([c]) Kontrola rozpouštědla DMSO (1 μl/jamku).

Tabulka 5

Kritéria výsledků pro QC-destičku

	T	E2
Bazální produkce hormonu při kontrole rozpouštědla (SC)	≥ 5násobek LOQ	≥ 2,5násobek LOQ
Indukce (10 μM forskolinu)	≥ 1,5násobek SC	≥ 7,5násobek SC
Inhibice (1μM prochlorazu)	≤ 0,5násobek SC	≤ 0,5násobek SC

POSTUP EXPOZICE CHEMICKÉ LÁTCE

38. Preinkubované buňky se vyjmou z inkubátoru (odstavec 21) a zkontrolují pod mikroskopem, aby před dávkováním bylo jisté, že jsou v dobrém stavu (přichycení, morfologie).

39. Buňky jsou umístěny do biologické bezpečnostní skříně (laminární box) a obohacené médium je odstraněno a nahrazeno novým obohaceným médiem (1 ml/jamku). Pro tuto zkušební metodu se jako rozpouštědlo upřednostňuje DMSO. Pokud je však důvod pro použití jiných rozpouštědel, mělo by být popsáno vědecké zdůvodnění. Buňky jsou vystaveny zkoušené chemické látce přidáním 1 μl vhodného zásobního roztoku v DMSO (viz dodatek II validační zprávy (4)) na 1 ml obohaceného média (objem jamky). Výsledkem toho je konečná koncentrace 0,1 % DMSO v jamkách. Pro zajištění odpovídající směsi se obecně upřednostňuje, aby byl vhodný zásobní roztok zkoušené chemické látky v DMSO smíchán s obohaceným médiem, aby se dosáhlo požadované konečné koncentrace pro každou dávku a aby směs byla přidána do každé jamky bezprostředně po odstranění starého média. Je-li použita tato možnost, měla by koncentrace DMSO (0,1 %) zůstat ve všech jamkách stejná. U jamek obsahujících dvě největší koncentrace se vizuálně pomocí stereomikroskopu posoudí, zda se vytvořily sraženiny nebo zákal, což je známka neúplné rozpustnosti zkoušené chemické látky. Pokud jsou takové podmínky (zákal, tvorba sraženin) pozorovány, jsou přezkoumány i jamky obsahující další nižší koncentrace (a tak dále) a koncentrace, kde se látka zcela nerozpustila, musí být vyloučeny pro účely dalšího hodnocení a analýzy. Destička se na 48 hodin vrátí do inkubátoru při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO_2. Rozvržení destičky se zkoušenou chemickou látkou je uvedeno v tabulce 6. Zásoby 1–7 ukazují umístění rostoucích dávek zkoušené chemické látky.

▼M5

Tabulka 6

Schéma dávkování pro expozici buněk H295R zkoušeným chemickým látkám v 24 jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Zásoba 4	Zásoba 4	Zásoba 4
B	Zásoba 1	Zásoba 1	Zásoba 1	Zásoba 5	Zásoba 5	Zásoba 5
C	Zásoba 2	Zásoba 2	Zásoba 2	Zásoba 6	Zásoba 6	Zásoba 6
D	Zásoba 3	Zásoba 3	Zásoba 3	Zásoba 7	Zásoba 7	Zásoba 7

40. Po 48 hodinách jsou expoziční destičky vyňaty z inkubátoru a každá jamka se zkontroluje pod mikroskopem ohledně stavu buněk (přichycení, morfologie, stupeň konfluence) a známek cytotoxicity. Médium z každé jamky je rozděleno na dvě stejná množství (každé přibližně 490 µl) a přeneseno do dvou samostatných, řádně označených ampulek (tj. jeden díl poskytuje pro každou jamku náhradní vzorek). Aby se předešlo vyschnutí buněk, odstraňuje se médium po řadách nebo sloupcích najednou a nahrazuje se médiem pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity buněk. Pokud je nutné životaschopnost/cytotoxicitu buněk změřit okamžitě, je do každé jamky přidáno 200 µl PBS s Ca^{2+} a Mg^{2+}. Média se zmrazí při teplotě – 80 °C až do dalšího zpracování pro analýzu koncentrací hormonů (viz odstavce 44–46). I když hormony T a E2 uchovávané v médiu při teplotě – 80 °C jsou obecně stálé po dobu nejméně tří měsíců, měla by být v každé laboratoři zdokumentována stálost hormonů během uskladnění.

41. Okamžitě po odstranění média se pro každou expoziční destičku určí životaschopnost buněk/cytotoxicita.

Určení životaschopnosti buněk

42. Pro určení potenciálního vlivu zkoušené chemické látky na životaschopnost buněk není metoda testování životaschopnosti buněk/cytotoxicity předepsána, je možno ji zvolit. Zkouška by měla být schopna měřit skutečnou výši procentního podílu životaschopných buněk přítomných v jamce nebo by mělo být prokázáno, že ji lze přímo srovnat se zkouškou Live/Dead® (její lineární funkcí) (viz dodatek III validační zprávy (4)). Alternativní zkouškou, u které se ukázalo, že funguje stejně dobře, je test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid] (18). Posouzení životaschopnosti buněk využívající výše uvedené metody je relativní měření, které nemusí nutně být lineární závislé na absolutním počtu buněk v jamce. Proto by analyzující pracovník měl provést subjektivní paralelní vizuální posouzení každé jamky a je zapotřebí udělat digitální snímky kontrol rozpouštědel a dvou největších necytotoxických koncentrací, které se archivují, aby bylo možno později posoudit skutečnou hustotu buněk, bude-li to zapotřebí. Pokud se na základě vizuální prohlídky nebo podle důkazů ze zkoušky životaschopnosti/cytotoxicity zdá, že počet buněk narostl, je nutné zdánlivý nárůst ověřit. Je-li nárůst počtu buněk ověřen, mělo by to být uvedeno v protokolu o zkoušce. Životaschopnost buněk bude vyjádřena v poměru k průměrné reakci při kontrolách s rozpouštědly, která je považována za 100 % životaschopných buněk, výpočet se provádí podle pravidel metody použité k určení cytototoxicity. Pro zkoušku MTT lze použít následující vzorec:

▼M5

% životaschopných buněk = (reakce v jamce – průměrná reakce v jamkách s aplikovaným MeOH [= 100 % odumřelých]) ÷ (průměrná reakce v jamkách SC – průměrná reakce v jamkách s aplikovaným MeOH [= 100 % odumřelých])

43. Do závěrečné analýzy údajů by neměly být zařazeny jamky s životaschopností nižší než 80 %, v poměru k průměrné životaschopnosti při kontrolách s rozpouštědly (= 100 % životaschopnost). Inhibice steroidogeneze, vyskytující se při cytotoxicitě kolem 20 %, by měla být pečlivě posouzena, aby bylo zajištěno, že příčinou inhibice není právě cytotoxicita.

Analýza hormonů

44. Každá laboratoř může pro analýzu T a E2 použít systém měření hormonů podle své volby. Zbylé podíly média z každé experimentální skupiny lze použít pro přípravu dalších ředění tak, aby byly k dispozici koncentrace pro lineární část standardní křivky. Jak je uvedeno v odstavci 29, každá laboratoř by měla prokázat soulad svého systému měření hormonů (např. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kritérii pro kontrolu kvality tak, že provede analýzu obohaceného média doplněnou o vnitřní kontrolu hormonů před provedením pokusů pro kontrolu kvality nebo zkoušením chemických látek. Aby bylo zajištěno, že součásti systému zkoušení nebudou rušivě zasahovat do měření hormonů, bude možná zapotřebí hormony před jejich měřením z média extrahovat (viz odstavec 30 s podmínkami, za kterých je nebo není extrakce požadována). Doporučuje se provést extrakci v souladu s postupy uvedenými v dodatku III validační zprávy (4).

45. Pokud se k měření produkce hormonů používá komerční zkušební sada (*kit*), měla by být provedena analýza hormonů v souladu s manuály, které dodal výrobce zkušební sady. Většina výrobců má jedinečný postup, kterým se mají analýzy hormonů provádět. Roztoky vzorků je třeba upravit, aby očekávané koncentrace hormonů pro kontroly roztoků spadaly do středu lineárního rozmezí standardní křivky konkrétní zkušební sady (dodatek III validační zprávy (4)). Hodnoty, které leží mimo lineární část standardní křivky, by měly být zamítnuty.

46. Konečné koncentrace hormonů se vypočítají takto:

Příklad:

Extrahováno:	450 µl média
Rekonstituováno v:	250 µl zkušebního pufru
Ředění při zkoušce:	1:10 (s cílem zajistit, aby se vzorek dostal do lineárního rozmezí standardní křivky)
Koncentrace hormonu při zkoušce:	150 pg/ml (již přizpůsobena koncentraci na 1 ml zkoušeného vzorku)
Výtěžnost:	89 %
Konečná koncentrace hormonů =	(Koncentrace hormonů (na 1 ml) ÷ výtěžnost) (faktor ředění)
Konečná koncentrace hormonů =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Výběr zkušebních koncentrací

47. V rámci zkoušky by měly být provedeny minimálně dva nezávislé pokusy. Pokud starší informace, například informace o limitech rozpustnosti nebo cytotoxicitě neposkytují základ pro výběr zkušebních koncentrací, doporučuje se, aby zkušební koncentrace pro počáteční pokus byly voleny v intervalech logaritmické škály, přičemž 10^{-3} M je maximální koncentrace. Pokud je chemická látka rozpustná a není při žádné ze zkoušených koncentrací cytotoxická a první pokus byl pro všechny koncentrace negativní, pak to musí být potvrzeno při jednom dalším pokusu za stejných podmínek, za jakých proběhl první pokus (tabulka 7). Pokud jsou výsledky prvního pokusu *nejednoznačné* (tj. násobek efektu je statisticky významně odlišný od kontrolní hodnoty pouze při jedné koncentraci) nebo pozitivní (tj. násobná změna je při dvou nebo více následujících koncentracích statisticky významná), zkouška by se měla zopakovat s upřesněním vybraných koncentrací, jak ukazuje tabulka 7. Aby se zjistil účinek, měly by být zkušební koncentrace v pokusech 2 a 3 (uskuteční-li se) upraveny na základě výsledků hraničních koncentrací úvodního pokusu, které vyvolaly účinek s použitím koncentrací v intervalech 1/2-log (např. pokud původní pokus 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM vyústil v indukce při 1 a 10 μM, koncentrace zkoušené ve druhém pokusu by měly být 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), pokud pro dosažení LOEC nemusí být uplatněny nižší koncentrace. Ve druhém uvedeném případě by ve druhém pokusu, při kterém se použije stupnice 1/2-log, mělo být použito nejméně pět koncentrací pod nejnižší koncentrací zkoušenou v prvním pokusu. Pokud druhý pokus nepotvrdí výsledky prvního pokusu (tj. při dříve pozitivně zkoušené koncentraci ± 1 přírůstek koncentrace neprokáže statistickou významnost), je nutné provést třetí experiment za původních zkušebních podmínek. Nejednoznačné výsledky v prvním pokusu jsou považovány za negativní, pokud pozorovaný účinek nemohl být potvrzen v žádném ze dvou následných pokusů. Nejednoznačné výsledky jsou považovány za pozitivní odpovědi (účinek), pokud lze odpověď potvrdit v nejméně jednom dalším pokusu v rámci ± 1 přírůstku koncentrace (viz oddíl 55 postupu při interpretaci údajů).

Tabulka 7

Matice rozhodnutí pro možné výsledné scénáře

Pokus 1	Pokus 2		Pokus 3		Rozhodnutí	
Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Pozitivní	Negativní
Negativní	Potvrdit ([a])	Negativní	Konec			X
Negativní	Potvrdit ([a])	Pozitivní	Upřesnit ([b])	Negativní		X
Nejednoznačné	Upřesnit ([b])	Negativní	Potvrdit ([a])	Negativní		X
Nejednoznačné ([c])	Upřesnit ([b])	Negativní	Potvrdit ([a])	Pozitivní	X	
Nejednoznačné ([c])	Upřesnit ([b])	Pozitivní			X	
Pozitivní	Upřesnit ([b])	Negativní	Potvrdit ([a])	Pozitivní	X	

▼M5

Pokus 1	Pokus 2		Pokus 3		Rozhodnutí	
Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Pozitivní	Negativní
Negativní	Potvrdit ([a])	Pozitivní	Upřesnit ([b])	Pozitivní	X	
Pozitivní	Upřesnit ([b])	Pozitivní	Konec		X	

([a]) Potvrdit předchozí pokus pomocí stejné struktury experimentu.
([b]) Provést zkoušku znovu s intervalem koncentrací 1/2-log (stanovení meze u koncentrace, která při předchozím experimentu dopadla výrazně jinak).
([c]) Násobná změna při jedné koncentraci se ze statistického hlediska výrazně liší od kontrolní hodnoty.

Kontrola kvality testu

48. Kromě splnění kritérií pro QC-destičky by měla být splněna i další kritéria kvality, která jsou stanovena v tabulce 8 a která se týkají přijatelných variací mezi replikovanými jamkami, opakovanými experimenty, linearity a citlivosti systémů měření hormonů, rozdílu mezi opakovanými měřeními hormonů téhož vzorku, a procentní výtěžnosti standardního přídavku hormonů po extrakci média (je-li to použitelné; viz odstavec 30 ohledně požadavků extrakce). Aby údaje mohly být použity pro další hodnocení, měly by spadat do přijatelných rozmezí definovaných pro každý parametr. Pokud tato kritéria nejsou splněna, mělo by být do pracovního formuláře poznamenáno, že kritéria kontroly kvality nebyla u daného vzorku splněna a že je nutné vzorek analyzovat znovu nebo ho vypustit ze souboru údajů.

Tabulka 8

Přijatelná rozmezí a/nebo variace (%) pro parametry zkušební destičky pro zkoušku H295R.

LOQ: mez kvantifikace systému měření hormonů. CV: variační koeficient; SC: kontrola s rozpouštědlem; DPM: rozpady za minutu

	Srovnání mezi	T	E2
Bazální produkce hormonů při SC	O násobek větší než LOQ	≥ 5násobek	≥ 2,5násobek
Experimenty v oblasti expozice – v rámci CV destičky pro SC (replikované jamky)	Absolutní koncentrace	≤ 30 %	≤ 30 %
Experimenty v oblasti expozice – mezi destičkami CV pro SC (opakované experimenty)	Násobná změna	≤ 30 %	≤ 30 %
Systém měření hormonů – citlivost	Zjistitelný násobný pokles poměrný k SC	≥ 5násobek	≥ 2,5násobek
Systém měření hormonů – opakovaná měření CV pro SC ([a])	Absolutní koncentrace	≤ 25 %	≤ 25 %
Extrakce média – výtěžnost interního 3H standardu (použije-li se)	DPM	≥ 65 % nominální	

([a]) Odkazuje na opakovaná měření téhož vzorku

▼M5

ANALÝZA ÚDAJŮ A ZPRÁVY

Analýza údajů

49. Pro vyhodnocení relativního nárůstu/poklesu chemicky změněné produkce hormonů by se výsledky měly normalizovat na střední hodnotu kontroly s rozpouštědlem (*solvent control*, SC) u každé zkušební destičky a výsledky by se měly vyjádřit jako změny relativní k SC v každé zkušební destičce. Veškeré údaje musí být vyjádřeny jako střední hodnoty ± 1 směrodatná odchylka (*standard deviation*, SD).

50. Do analýzy údajů by měly být zahrnuty pouze údaje o hormonech z jamek, v nichž byla cytotoxicita nižší než 20 %. Relativní změny by se měly vypočítat takto:

Relativní změna = (koncentrace hormonů v každé jamce) ÷ (střední koncentrace hormonů ve všech jamkách pro kontrolu s rozpouštědlem).

51. Pokud se na základě vizuální prohlídky jamky nebo dle důkazů ze zkoušky životaschopnosti/cytotoxicity popsané v odstavci 42 zdá, že narostl počet buněk, je nutné zdánlivý nárůst ověřit. Je-li nárůst počtu buněk ověřen, mělo by to být uvedeno v závěrečné zprávě.

52. Před provedením statistických analýz by měly být vyhodnoceny předpoklady normality rozdělení a homogenity rozptylu. Normalita by se měla hodnotit pomocí standardních grafů pravděpodobnosti (*probability plot*) nebo jiné vhodné statistické metody (např. Shapiro-Wilkův test). Pokud nejsou údaje (násobné změny) distribuovány normálně, měl by být pro účely aproximace normální distribuce učiněn pokus o jejich transformaci. Pokud jsou údaje distribuovány normálně nebo se přibližují normální distribuci, měly by být rozdíly mezi exponovanými skupinami a kontrolou s rozpouštědlem analyzovány pomocí parametrického testu (např. Dunnettův test), kde *koncentrace* je nezávislá a *reakce* (násobná změna) závislá proměnná. Pokud údaje nejsou normálně distribuovány, měl by se použít neparametrický test (např. Kruskal Wallisův test, Steelův srovnávací „Many-one rank“ test). Rozdíly jsou považovány za významné, když platí $p \leq 0,05$. Statistická hodnocení se provádějí na základě průměrných hodnot pro každou jamku, které představují nezávislé replikované údaje. Předpokládá se, že z důvodu velkých intervalů mezi dávkami v prvním pokusu (škála dekadických logaritmů) v mnoha případech nebude možné popsat jasné vztahy mezi koncentrací a odpovědí, tak aby dvě největší dávky byly v lineární části S křivky. Z tohoto důvodu budou pro první pokus nebo jakékoli jiné soubory údajů, kde nastane tato podmínka (např. tam, kde nelze odhadnout maximální účinnost), použity statistiky pevných proměnných typu I popsané výše.

53. Pokud více než dva údaje leží v lineární části křivky a pokud lze vypočítat maximální účinnost (jak se předpokládá u některých z druhých pokusů, které se provádějí pomocí semilogaritmických intervalů expozičních koncentrací), měl by být pro výpočet účinných koncentrací použit probitový, logitový nebo jiný vhodný regresní model (např. EC50 a EC20).

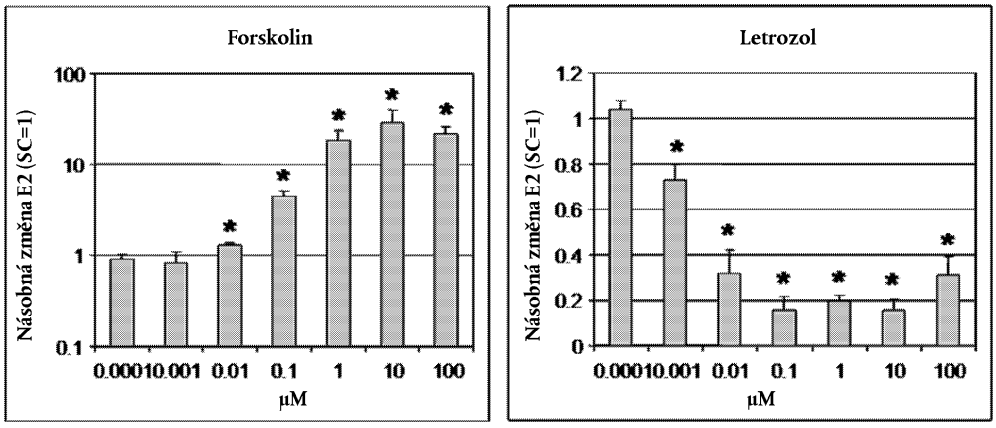
54. Výsledky by měly být prezentovány v grafickém (sloupcové diagramy vyjadřující střední hodnotu ± 1 SD) a tabulkovém formátu (LOEC/NOEC, směr účinku a síla maximální odpovědi, která je součástí údajů typu dávka–reakce) (viz např. obrázek 3). Posouzení údajů se považuje za platné pouze v případě, že se opírá nejméně o dva nezávisle provedené pokusy. Experiment nebo pokus se považuje za nezávislý, pokud byl proveden v jiný den za pomoci nového souboru roztoků a kontrol. Rozmezí koncentrací použitých v pokusech 2 a 3 (v případě potřeby) lze upravit na základě výsledků pokusu 1 tak, aby bylo lépe definováno rozmezí závislosti dávka-odpověď zahrnující LOEC (viz odstavec 47).

▼M5

Obrázek 3

Příklad prezentace a hodnocení údajů získaných během zkoušky H295R v grafickém a tabulkovém formátu

Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly od kontroly s rozpouštědlem ($p < 0,05$). LOEC: nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem; max. změna: maximální síla reakce pozorovaná při jakékoli koncentraci ve vztahu k průměrné reakci SC (= 1)



Chemická látka	LOEC	Max. změna
Forskolin	0,01	0,15 násobek
Letrozol	0,001	29 násobek

Postup při interpretaci údajů

55. Má se za to, že zkoušená chemická látka je pozitivní, pokud se násobná indukce statisticky liší ($p \leq 0,05$) od kontroly s rozpouštědlem při dvou sousedních koncentracích nejméně ve dvou nezávislých pokusech (tabulka 7). Má se za to, že zkoušená chemická látka je negativní po dvou nezávislých negativních pokusech nebo při třech pokusech, které zahrnují dva negativní pokusy a jeden dvojznačný nebo pozitivní pokus. Pokud údaje získané při třech nezávislých experimentech nesplňují kritéria rozhodnutí uvedená v tabulce 7, nelze výsledky pokusů interpretovat. Do interpretace výsledků by neměly být zahrnuty výsledky při koncentracích překračujících limity rozpustnosti nebo při cytotoxických koncentracích.

Závěrečná zpráva

56. Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkušební zařízení

— název a adresa zařízení,

— vedoucí studie a další pracovníci a jejich povinnosti v rámci studie,

— data zahájení a ukončení studie.

▼M5

Zkoušená chemická látka, chemická činidla a kontroly

— totožnost (název, příp. číslo CAS), zdroj, číslo šarže, čistota, dodavatel a charakterizace zkoušené chemické látky, chemických činidel a kontrol,

— fyzikální povaha a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky,

— podmínky uskladnění a metoda a četnost přípravy zkoušených chemických látek, chemických činidel a kontrol,

— stabilita zkoušené chemické látky.

Buňky

— zdroj a typ buněk,

— počet buněčných pasáží (identifikátor buněčné pasáže) buněk použitých při zkoušce,

— popis postupů uchovávání buněčných kultur.

Požadavky před zkouškou (je-li to relevantní)

— popis a výsledky testu chemické interference hormonů,

— popis a výsledky měření účinnosti extrakce hormonů,

— standardní a kalibrační křivky pro všechny analytické zkoušky, které budou provedeny,

— limity detekce pro vybrané analytické zkoušky.

Zkušební podmínky

— složení média,

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— hustota buněk (odhadované nebo změřené buněčné koncentrace během 24 hodin a 48 hodin),

— rozpustnost zkoušené chemické látky (limit rozpustnosti, je-li určen),

— inkubační doba a podmínky.

Výsledky zkoušek

— prvotní údaje týkající se jednotlivých jamek pro kontroly a testované látky – každé opakované měření ve formě původních údajů získaných z přístroje použitého k měření produkce hormonů (např. OD, fluorescenční jednotky, DPM atd.),

— prokázání normality rozdělení nebo vysvětlení transformace údajů,

— průměrná odpověď ± 1 SD pro každou měřenou jamku,

— údaje o cytotoxicitě (zkoušené koncentrace, které způsobily cytotoxicitu),

— potvrzení, že byly splněny požadavky kontroly kvality,

▼M5

— relativní účinek v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem po korekci na cytotoxicitu,

— sloupcový graf ukazující vztah (násobnou změnu) při každé koncentraci, SD a statistickou významnost, jak je uvedeno v odstavcích 49–54.

Interpretace údajů

— uplatnění postupu pro interpretaci údajů na výsledky a diskuse o nálezech.

Diskuse

— Vyplývají ze studie nějaké známky týkající se toho, že by údaje o T/E2 mohly být ovlivněny nepřímými účinky na dráhy gluko- a mineralokortikoidů?

Závěry

LITERATURA

1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v dodatku 2 kapitoly B.54 této přílohy.

2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Environ. Pharmacol.,* 217, 114–124.

3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Tecn. Pollut. Res*., 14, 23–30.

4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. K dispozici na internetové adrese [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, k dispozici na adrese: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.* 81, 78–89.

8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Environ. Pharmacol.,* 182, 44–54.

9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼M5

10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Technol.,* 39:2777–2785.

14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Ind. Res.,* 17:1137–1148.

15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

16) Kapitola B.55 této přílohy: Hershbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.

17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼M5

Dodatek

DEFINICE

CV se rozumí variační koeficient, který je definován jako poměr směrodatné odchylky distribuce k jejímu aritmetickému průměru.

CYP označuje cytochrom P450 monooxygenázy, což je rodina genů a enzymů z nich vyprodukovaných, které se účastní katalyzace široké škály biochemických reakcí zahrnujících syntézu a metabolismus steroidních hormonů.

Destička pro kontrolu kvality (QC-destička) je 24jamková destička obsahující dvě koncentrace pozitivních a negativních kontrol pro sledování chování nové dávky buněk nebo pro zajištění pozitivních kontrol pro zkoušku při zkoušení chemických látek.

DPM (*disintegration per minute*) je zkratkou pro rozpad za minutu. Je to počet atomů v daném množství radioaktivního materiálu, u něhož bylo zjištěno, že se rozpadne za jednu minutu.

E2 je 17β-estradiol, nejdůležitější estrogen v těle savců.

H295R buňkyjsou buňky lidského adrenálního karcinomu, které mají fyziologické charakteristiky zonálně nediferencovaných adrenálních buněk lidského plodu a které zajišťují expresi enzymů dráhy steroidogeneze. Lze je získat ze sbírky ATCC.

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

Konfluencí se rozumí pokrytí nebo množství buněk, které je u buněk povoleno nad kultivačním médiem nebo v něm.

Kontrola kvality, zkráceně QC, označuje opatření nezbytná k zajištění platných údajů.

Lineární oblast je interval v rámci standardní křivky pro systém měření hormonů, kde výsledky jsou úměrné koncentraci analytu přítomného ve vzorku.

Mrazicí médium se používá ke zmrazování a uchovávání zmrazených buněk. Obsahuje zásobní médium, BD Nu-sérum a dimethylsulfoxid.

LOQ je zkratkou pro *mez kvantifikace* (‘*Limit of Quantification*’), a je to nejnižší množství chemické látky, které lze odlišit od nepřítomnosti této chemické látky (slepá hodnota) v rámci stanovené meze spolehlivosti. Pro účely této metody je LOQ obvykle definován výrobcem testovacích systémů, není-li specifikován jiným způsobem.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) je zkratkou pro nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem, tedy nejnižší úroveň koncentrace, u níž se reakce na zkoušku ze statistického hlediska liší od reakce na kontrolu rozpouštědla.

NOEC (*No Observed Effect Concentration*) je zkratkou pro koncentraci bez pozorovaných účinků, což je nejvyšší zkoušená koncentrace, kde nebyla zjištěna pozitivní odpověď.

Obohacené médium se skládá ze zásobního média s BD Nu-sérem a prémiovou směsí ITS+, viz dodatek II validační zprávy (4).

Pasáž je číslo udávající počet dělení buněk po zahájení kultivace ze zmrazených zásob. Počáteční pasáž, která byla vytvořena ze zmrazených zásob, nese číslo jedna (1). Buňky, které byly rozděleny jednou, jsou označeny jako pasáž 2 atd.

PBS je Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru.

Pokus je nezávislý experiment, který je charakterizován novým souborem roztoků a kontrol.

Steroidogeneze je syntetická dráha vedoucí od cholesterolu k různým steroidním hormonům. Některé meziprodukty v dráze steroidní syntézy, např. progesteron a testosteron, jsou důležitými hormony samy o sobě, ale slouží také jako prekurzory hormonů dále v syntetické dráze.

T představuje testosteron, jeden ze dvou nejdůležitějších androgenů v těle savců.

▼M5

Trypsin 1X je zředěný roztok enzymu trypsin, serinové proteázy vyskytující se ve dvanácterníku, používaný k uvolňování buněk z destičky pro kultivaci buněk, viz dodatek III validační zprávy (4).

Zásobní médium je základ pro přípravu dalších roztoků/reagencií. Skládá se ze směsi Dulbeccovy modifikace Eagleova média a Hamovy směsi živin F12 v poměru 1:1 (DMEM/F12) v 15mM pufru HEPES bez fenolové červeně nebo hydrogenuhličitanu sodného. Hydrouhličitan sodný se přidává jako pufr, viz dodatek II validační zprávy (4).

Zkoušenou chemickou látkou se rozumí jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Zkušební destičkou se rozumí destička, na které jsou buňky H295R vystaveny zkoušeným chemickým látkám. Zkušební destičky obsahují kontrolu s rozpouštědlem a zkoušenou chemickou látku v sedmi úrovních koncentrace ve třech provedeních.

▼M5

B.58 **ZKOUŠKY GENOVÝCH MUTACÍ U SOMATICKÝCH A ZÁRODEČNÝCH BUNĚK TRANSGENNÍCH HLODAVCŮ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 488 (2013). Zkušební metody EU jsou k dispozici pro širokou škálu *in vitro* testů mutagenity, které jsou schopny odhalit chromozomové a/nebo genové mutace. Existují zkušební metody pro testování *in vivo* (ty detekují chromozomové aberace a neplánovanou syntézu DNA), ale pro genové mutace takové metody dosud nebyly k dispozici. Zkoušky mutací u transgenních hlodavců (*Transgenic Rodent*, TGR) splňují potřebu praktických a obecně dostupných zkoušek *in vivo* pro genové mutace.

2. O zkouškách mutací u TGR existují rozsáhlé přehledové dokumenty (24) (33). Tyto zkoušky používají transgenní potkany a myši, jejichž organismy obsahují velké množství kopií chromozomově integrovaných plazmidových nebo fágových shuttle vektorů. Transgeny obsahují reporterové geny pro zjišťování různých typů mutací indukovaných *in vivo* zkoušenými chemickými látkami.

3. Mutace, k nimž dochází u hlodavců, se získávají pomocí obnovy/odkrytí transgenu a analýzy fenotypu reporterového genu v bakteriálním hostiteli, který postrádá reporterový gen. Zkoušky genových mutací u TGR posuzují mutace indukované u geneticky neutrálních genů znovu získaných v podstatě z jakékoli tkáně hlodavce. Tyto analýzy tudíž obcházejí mnohá ze stávajících omezení spojených se studiem genových mutací *in vivo* u endogenních genů (např. omezení na tkáně vhodné pro analýzu, negativní/pozitivní selekce proti mutacím).

4. Posouzení závažnosti důkazů naznačuje, že transgeny reagují na mutageny podobně jako endogenní geny, zejména pokud se týká detekce substituce párů bází, posunových mutací a malých delecí a insercí (24).

5. Mezinárodní semináře o zkoušení genotoxicity (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) schválily zařazení zkoušek genových mutací u TGR mezi metody zjišťování genových mutací *in vivo* a doporučily postup pro jejich provádění (15) (29). Tato zkušební metoda (B.58) se opírá o tato doporučení. Další analýzu podporující používání tohoto postupu lze najít v (16).

6. Předpokládá se, že v budoucnu bude možné zkombinovat zkoušky genových mutací u TGR se studií toxicity při opakované aplikaci (kapitola B.7 této přílohy). Je však třeba mít další údaje, aby bylo zajištěno, citlivost zkoušek genových mutací u TGR nebude ovlivněna kratším, jednodenním intervalem mezi ukončením aplikace a odběrem vzorků, jak je tomu u studie toxicity s opakovanou aplikací v porovnání s třídenním intervalem používaným při zkouškách genových mutací u TGR. Je také nutné mít údaje o tom, že provedení studie s opakovaným podáváním látky nebude negativně ovlivněno použitím transgenního kmene namísto tradičních kmenů hlodavců. Až tyto údaje budou k dispozici, bude tato zkušební metoda aktualizována.

7. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

▼M5

VÝCHOZÍ ÚVAHY

8. Zkoušky genových mutací u TGR, pro které je k dispozici dostatek údajů, aby mohly být zařazeny v této zkušební metodě, jsou tyto: myš s bakteriofágem *lacZ* (Muta™Mouse); myš s plazmidem *lacZ*, delta myš a potkan *gpt* (*gpt* a Spi$^-$), myš a potkan *lacI* (Big Blue®), prováděné podle standardních podmínek. Kromě toho lze pro posouzení mutací v modelech Big Blue® a Muta™Mouse použít zkoušku pozitivní selekce *cII*. Mutageneze v modelech TGR se zpravidla posuzuje jako četnost mutací; v případě potřeby však může další informace dodat molekulární analýza mutací (viz odstavec 24).

9. Tyto zkoušky genových mutací *in vivo* u hlodavců jsou při posuzování mutagenního rizika důležité zejména proto, že účinky zjištěné v těchto zkouškách jsou závislé na metabolismu *in vivo*, farmakokinetice, procesech opravy DNA a translézní syntéze DNA, ačkoli ty se mohou u jednotlivých druhů, tkání a typů poškození DNA lišit. Zkouška *in vivo* pro genové mutace je užitečná pro další šetření mutagenního účinku zjištěného systémem *in vitro* a pro následné monitorování výsledků testů pomocí jiných cílových parametrů *in vivo* (24). Vedle toho, že jsou genové mutace příčinným vztahem spojeny se vznikem rakoviny, jsou také významným parametrem pro predikci nezhoubných onemocnění způsobených mutacemi v somatických tkáních (12) (13), jakož i pro onemocnění přenášená zárodečnými buňkami.

10. Existují-li důkazy o tom, že zkoušená chemická látka nebo relevantní metabolit se nedostanou do žádné z relevantních tkání, není vhodné provádět zkoušku genových mutací u TGR.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Ve zkouškách popsaných v odstavci 8 je cílový gen původně bakteriální nebo bakteriofágový a prostředkem pro znovuzískání genu z genomické DNA hlodavců je začlenění transgenu do bakteriofágu λ nebo plazmidového shuttle vektoru. Proces zahrnuje extrakci genomické DNA ze sledované tkáně hlodavců, zpracování genomické DNA *in vitro* (tj. sbalování vektorů λ nebo ligace a elektroporace plazmidů pro obnovu shuttle vektoru) a následné zjištění mutací v bakteriálních hostitelích za vhodných podmínek. Zkoušky využívají neutrální transgeny, které lze snadno znovu získat z většiny tkání.

12. Základní experiment zkoušky genových mutací u TGR zahrnuje podávání chemické látky hlodavcům po určité časové období. Chemické látky mohou být podávány jakýmkoli vhodným způsobem, včetně implantace (např. zkoušení lékařských přístrojů). Celkové období, během kterého je zvířeti látka podávána, se nazývá doba aplikace. Po aplikaci obvykle následuje období před utracením, během kterého není chemická látka podávána a kdy jsou neopravené léze DNA fixovány do stálých mutací. V literatuře je toto období označováno různě: jako doba manifestace, doba fixace nebo doba exprese; toto období končí odběrem vzorků(15) (29). Po utracení zvířete je genomická DNA izolována ze sledované tkáně (tkání) a vyčištěna.

▼M5

13. Údaje pro jednu tkáň z jednoho zvířete z více sbalení/ligací jsou obvykle agregovány a četnost mutací je obecně hodnocena pomocí celkového počtu cca 10^5 až 10^7 jednotek tvořících plak nebo kolonii. Při používání metod pozitivní selekce počet jednotek tvořících plak určen pomocí samostatného souboru neselektivních destiček.

14. Metody pozitivního selektivního výběru byly vyvinuty s cílem usnadnit zjišťování mutací v genu *gpt* [myš a potkan *gpt*, fenotyp *gpt*⁻ (20) (22) (28)] a genu *lacZ* [Muta™Mouse nebo myš s plazmidem *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; zatímco mutace genu *lacI* ve zvířatech Big Blue® jsou zjišťovány prostřednictvím neselektivní metody, která identifikuje mutace pomocí tvorby barevných (modrých) plaků. Metodika pozitivní selekce se používá i k zjišťování bodových mutací vznikajících v genu *cII* shuttle vektoru bakteriofágu λ [myš nebo potkan Big Blue® a Muta™Mouse (17)] a mutací vyvolaných delecí v genech λ *red* a *gam* [selekce Spi ⁻ u delta myši a potkana *gpt* (21) (22) (28)]. Četnost mutacíse vypočítá vydělením počtu plaků/plazmidů obsahujících mutace v transgenu celkovým počtem plaků/plazmidů získaných z téhož vzorku DNA. Ve studiích genových mutací TGR je četnost mutací výsledným parametrem. Četnost mutací lze navíc určit jako frakci buněk nesoucích nezávislé mutace; pro tento výpočet je požadována korekce pro klonální expanzisekvenováním obnovených mutací (24).

15. Mutace hodnocené v zkouškách bodových mutací *lacI, lacZ, cII* a *gpt* jsou tvořeny primárně mutacemi substitucí páru bází, posunovými mutacemi a malými insercemi/delecemi. Relativní podíl těchto typů mutací mezi spontánními mutacemi je podobný podílu, který je pozorován u endogenního genu *Hprt*. Velké delece jsou zjišťovány pouze u selekce Spi ⁻ genu a zkoušek plazmidů *lacZ* (24). Předmětem zájmu jsou zde mutace *in vivo*, které vznikají u myší nebo potkanů. Mutace *in vitro* a *ex vivo*, které mohou vzniknout během znovuzískávání, replikace nebo opravy fágu/plazmidu, jsou relativně vzácné a v některých systémech mohou být speciálně identifikovány nebo vyloučeny systémem pozitivní selekce u bakteriálního hostitele.

POPIS METODY

Přípravy

Volba druhu zvířat

16. V současné době je k dispozici široká paleta modelů pro zjištění genových mutací u transgenních myší a tyto systémy se používají častěji než modely transgenních potkanů. Pokud je potkan jasně vhodnějším modelem než myš (např. pokud je při šetření mechanismu karcinogeneze pozorován nádor pouze u potkanů, pro korelaci se studií toxicity u potkanů, nebo pokud je o metabolismu potkanů známo, že je podobnější lidskému metabolismu), mělo by být zváženo použití modelů transgenních potkanů.

Podmínky chovu a krmení

17. Teplota v místnosti s pokusnými zvířaty by měla být v ideálním případě 22 °C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by, kromě doby úklidu místnosti, neměla přesáhnout 70 %, cílem by mělo být dosažení relativní hodnoty 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé s každodenním střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní potravu a k pití by mělo být

▼M5

k dispozici neomezené množství vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látku, je-li látka podávána touto cestou. Zvířata by měla být umístěna v klecích v malých skupinkách (maximálně pět zvířat) stejného pohlaví, pokud se neočekává agresivní chování. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

18. Zdravá mladá pohlavně zralá dospělá zvířata (8–12 týdnů stará na začátku aplikace) jsou náhodně rozdělena do kontrolních a experimentálních skupin. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Příprava dávek

19. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Měly by být použity čerstvě připravené aplikační formy zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

20. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula.

Pozitivní kontroly

21. Měly by se zpravidla používat zvířata pro současnou pozitivní kontrolu. Avšak u laboratoří, které prokázaly způsobilost (viz odstavec 23) a tyto zkoušky používají běžně, lze do každé studie pro potvrzení úspěšného provedení metody zařadit DNA zvířat, která byla součástí předchozích pozitivních kontrol. Vzorky DNA z předchozích experimentů by měly být pořízeny ze stejných druhů a požadovaných tkání a měly by být náležitě skladovány (viz odstavec 36). Pokud se využívají souběžné pozitivní kontroly, není nutné podávat je stejným způsobem jako zkoušenou chemickou látku. O těchto pozitivních kontrolách by však mělo být známo, že indukují mutace v jedné nebo více sledovaných tkáních pro zkoušenou chemickou látku. Dávky pozitivních kontrolních chemických látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly slabé nebo mírné účinky, které nejlépe dokládají správné provedení a citlivost zkoušky. Příklady pozitivních kontrolních chemických látek a některé z jejich cílových tkání jsou uvedeny v tabulce 1.

▼M5

Tabulka 1

Příklady pozitivních kontrolních látek a některé z jejich cílových tkání

Chemická látka a číslo CAS	Název a číslo Einecs	Charakteristika	Cílová tkáň pro mutace	
			Potkan	Myš
1-ethyl-1-nitrosomočovina [č. CAS 759-73-9]	1-ethyl-1-nitrosomočovina [212-072-2]	Přímo působící mutagen	Játra, plíce	Kostní dřeň, tračník, epitel tračníku, střevo, játra, plíce, slezina, ledvina, buňky zrnité membrány na vaječnících, samčí zárodečné buňky
Ethyl-karbamát (uretan) [č. CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, ale produkuje pouze slabé účinky		Kostní dřeň, předžaludek, tenké střevo, játra, plíce, slezina
2,4-diaminotoluen [č. CAS 95-80-7]	4-methyl-1,3-fenylendiamin [202-453-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, také pozitivní při zkoušce Spi^-	Játra	Játra
Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]	Benzo[def]chrysen [200-028-5]	Mutagen, vyžaduje metabolismus	Játra, předstěra,	Kostní dřeň, prsa, tračník, předžaludek, žláznatý žaludek, srdce, játra, plíce, samčí zárodečné buňky

Negativní kontroly

22. Součástí každého odběru vzorků by měly být negativní kontroly s aplikací pouze rozpouštědla nebo vehikula, které jsou jinak prováděny stejně jako u experimentálních skupin. Nejsou-li k dispozici dosavadní nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky, měly by být do každého odběru vzorků zahrnuty i kontroly bez aplikace pro posouzení účinku vehikula.

Ověření způsobilosti laboratoře

23. Způsobilost pro tyto zkoušky by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat očekávané výsledky ze zveřejněných údajů (24) týkajících se: 1) četností mutací s chemickými látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s chemickými látkami uvedenými v tabulce 1, nemutagenů a kontrol vehikula; 2) znovuzískání transgenů z genomické DNA (např. účinnost sbalování).

Sekvenování mutací

24. Při použití výsledku zkoušky pro legislativní účely není vyžadováno sekvenování DNA mutací, obzvláště pak tam, kde bylo dosaženo jasného pozitivního nebo negativního výsledku. Údaje o sekvenování však mohou být užitečné při pozorování rozdílu mezi jedinci. V těchto případech lze sekvenování použít k vyloučení možnosti vzniku jackpotů nebo klonálních událostí identifikací podílu jedinečných mutací z konkrétní tkáně. Sekvenování přibližně 10 mutací na tkáň a zvíře by mělo být dostatečné pro jednoduché určení, zda klonální mutace přispívají k četnosti mutací. Sekvenování až 25 mutací bude možná nutné pro matematickou korekci četnosti mutací

▼M5

na klonalitu. O sekvenování mutací lze také uvažovat při zjištění malého nárůstu četnosti mutací (tj. mírné překročení hodnot kontrol bez aplikace). Rozdíly ve spektru mutací mezi koloniemi mutací ze zvířat, jimž je a není podávána látka, mohou podpořit rozhodnutí o mutagenním účinku (29). Spektra mutací mohou být rovněž užitečná pro formulování mechanistických hypotéz. Má-li být sekvenování zahrnuto do provedení studie, je třeba věnovat speciální pozornost plánování takových studií, zvláště s ohledem na počet mutací sekvenovaných na jeden vzorek, aby bylo možné dosáhnout adekvátní síly experimentu vzhledem k použitému statistickému modelu (viz odstavec 43).

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

25. Počet zvířat ve skupině by měl být stanoven předem tak, aby stačil k dosažení statistické síly nezbytné pro zjištění nejméně zdvojnásobení četnosti mutací. V jedné skupině bude minimálně pět zvířat. Pokud ale bude statistická síla nedostatečná, počet zvířat by měl být dle potřeby zvýšen. Zpravidla by se měli používat samci. V některých případech může být odůvodněné používat ke zkouškám pouze samice, například při zkoušení humánních léků pro ženy nebo při zkoumání ženského metabolismu. Pokud jsou mezi pohlavími z hlediska toxicity nebo metabolismu výrazné rozdíly, budou požadováni samci i samice.

Doba podávání

26. Na základě pozorování, že se mutace s každou aplikací akumulují, je nutný režim opakované každodenní aplikace po dobu 28 dnů. To je obecně považováno za přijatelné pro produkci dostatečné akumulace mutací slabými mutageny a pro poskytnutí doby expozice vhodné pro zjištění mutací v pomalu rostoucích orgánech. Pro některá hodnocení mohou být vhodné alternativní režimy aplikace a tyto alternativní harmonogramy podávání dávek by měly být vědecky odůvodněny v plánu studie. Aplikace by neměla být kratší než doba požadovaná pro úplnou indukci všech příslušných metabolizujících enzymů a kratší aplikace mohou vyžadovat několik intervalů pro odběr vzorků, přizpůsobených pro orgány s různou rychlostí růstu. Veškeré dostupné informace (např. o obecné toxicitě nebo metabolismu a farmakokinetice) by každopádně měly být použity při odůvodňování plánu studie, zejména pokud se odchyluje od výše uvedených standardních doporučení. Ačkoli se může zvýšit citlivost, doba aplikace delší než osm týdnů by měla být jasně vysvětlena a odůvodněna, jelikož dlouhé doby aplikace mohou způsobit zjevný nárůst četnosti mutací prostřednictvím klonální expanze (29).

Dávkování

27. Dávkování by mělo vycházet z výsledků studie pro stanovení rozmezí dávek, která měří obecnou toxicitu a která byla provedena se stejným způsobem expozice, nebo z výsledků starších studií subakutní toxicity. Při určování rozmezí dávek lze použít netransgenní zvířata stejného kmene hlodavců. V hlavní zkoušce by s cílem získat informace o závislosti účinku na dávce měla úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu (viz odstavec 22) a minimálně tři, náležitě rozvržené úrovně dávek, ledaže byla použita limitní dávka (viz odstavec 28). Nejvyšší dávka by měla být maximální tolerovaná dávka (MTD). MTD je definována

▼M5

jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly podle očekávání při stejném režimu dávkování k letalitě. Chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně. Použité dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně nulovou toxicitou.

Limitní zkouška

28. Pokud experimenty pro určení rozmezí dávek nebo stávající údaje získané u příbuzných kmenů hlodavců naznačují, že aplikace limitní dávky (viz níže) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky,a pokud by genotoxicita nebyla očekávána na základě údajů o strukturně příbuzných chemických látkách, nemusí být úplná studie se třemi úrovněmi dávek pokládána za nutnou. Pro dobu podávání v délce 28 dnů (tj. 28 každodenních aplikací) je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den. Pro dobu podávání v délce maximálně 14 dnů je limitní dávka 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den (harmonogramy podávání dávek odlišné od 28 každodenních aplikací by měly být vědecky odůvodněny v plánu studie, viz odstavec 26).

Podávání dávek

29. Zkoušená chemická látka se obvykle podává nitrožaludečně žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Z tohoto důvodu mohou být přijatelné i jiné způsoby expozice (například v pitné vodě, podkožně, nitrožilně, místně, inhalací, intratracheálně, stravou nebo implantací), pokud je bude možné odůvodnit. Intraperitoneální aplikace se nedoporučuje, protože to není fyziologicky relevantní způsob expozice člověka. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití objemů větších než tento by mělo být odůvodněno. S výjimkou dráždivých nebo žíravých chemických látek, které ve vyšších koncentracích mají obvykle navýšený účinek, měla by být variabilita aplikovaného objemu minimalizována tím, že aplikované koncentrace se nastaví tak, aby aplikovaný objem byl konstantní při všech úrovních dávek.

Doba odběru vzorků

Somatické buňky

30. Doba odběru vzorků je kritická proměnná, protože je určována dobou potřebnou pro fixaci mutací. Toto období závisí na příslušné tkáni a zdá se, že souvisí s dobou obratu buněčné populace, přičemž kostní dřeň a střevo reagují rychle a játra jsou mnohem pomalejší. Vhodným kompromisem pro měření četností mutací v rychle a pomalu se množících tkáních je 28 po sobě jdoucích každodenních aplikací (jak je uvedeno v odstavci 26) a odběr vzorků tři dny po konečné aplikaci, ačkoli za těchto podmínek se maximální četnost mutací v pomalu rostoucích tkáních nemusí projevit. Pokud jsou pomalu rostoucí tkáně obzvláště důležité, pak bude možná vhodnější pozdější doba odběru vzorků, a to 28 dní následujících po 28denní době podávání. V takových případech by pozdější doba odběru vzorků nahradila třídenní dobu odběru a musela by být vědecky odůvodněna.

▼M5

Zárodečné buňky

31. Zkoušky TGR jsou velmi vhodné pro studii indukce genových mutací v samčích zárodečných buňkách (7) (8) (27), kde je dobře definováno načasování a kinetika spermatogeneze (27). Nízké počty vajíček dostupných pro analýzu, dokonce i po superovulaci, a skutečnost, že v oocytu neprobíhá žádná syntéza DNA, vylučují detekci mutací v samičích zárodečných buňkách pomocí transgenních zkoušek (31).

32. Doby odběru vzorků pro samčí zárodečné buňky by měly být zvoleny tak, aby byl pokryt celý rozsah exponovaných buněčných typů po celou dobu vývoje zárodečných buněk a pro buňky ve stadiu zachyceném dobou odběru byla zajištěna dostatečná expozice. Progrese vývoje zárodečných buněk ze spermatogonálních kmenových buněk ve zralou spermii, která se dostane do chámovodu/ocasu nadvarletetrvá ~49 dnů u myší (36) a ~70 dnů u potkanů (34) (35). Po 28denní expozici s následnou třídenní dobou odběru vzorků budou akumulované spermie odebrané z chámovodu/ocasu nadvarlete (7)(8) představovat populaci buněk, které byly předmětem expozice přibližně během druhé poloviny spermatogeneze, která zahrnuje meiotické a postmeiotické období, nikoli však spermatogonální období nebo období kmenových buněk. Pro adekvátní odběr vzorků buněk z chámovodu/ocasu nadvarlete, které byly během období expozice spermatogonálními kmenovými buňkami, je vyžadována další doba odběru vzorků v minimální délce sedmi týdnů (myši) nebo deseti týdnů (potkani) po ukončení aplikace.

33. Buňky vypuzené ze semenných tubulů po režimu 28 + 3 dny zahrnují smíšenou populaci obohacenou pro všechna stadia vývoje zárodečných buněk (7) (8). Odběr vzorků těchto buněk pro detekci genových mutací nezajišťuje tak přesné posouzení stadií, v nichž jsou indukovány mutace zárodečných buněk, jakého lze dosáhnout při odběru vzorků spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete (z tubulů se totiž odebírají vzorky celé řady typů zárodečných buněk a tato buněčná populace bude kontaminována určitými somatickými buňkami). Odběr vzorku buněk ze semenných tubulů vedle spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete po režimu odběru 28 + 3 dny by ale zajistil určité pokrytí buněk exponovaných ve většině fází vývoje zárodečných buněk a může být užitečný pro zjišťování určitých mutagenů zárodečných buněk.

Pozorování

34. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být vážena nejméně jednou týdně a při utracení. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (23).

▼M5

Odběr tkání

35. Mělo by být jasně definováno odůvodnění odběru tkání. Jelikož lze studovat indukci mutací v podstatě v jakékoli tkáni, výběr tkání, které budou odebrány, by se měl opírat o důvody, k jakému účelu má být studie provedena, a o jakékoli stávající údaje o mutagenitě, karcinogenitě nebo toxicitě týkající se šetřené chemické látky. K důležitým zvažovaným faktorům by měl patřit způsob podání (na základě pravděpodobných způsobů expozice člověka), předpokládaná distribuce látky v tkáních a možný mechanismus působení. Při absenci jakýchkoli základních informací by mělo být odebráno několik somatických tkání, které mohou být zajímavé. Ty by měly reprezentovat rychle rostoucí a pomalu rostoucí tkáně a tkáně prvního kontaktu. Kromě toho by pro případ, že bude v budoucnosti požadována analýza mutagenity zárodečných buněk, měly být ze semenných tubulů (viz odstavce 32 a 33) odebrány spermie z chámovodu/ocasu nadvarlat a vyvíjející se zárodečné buňky. Měla by být zjištěna hmotnost orgánů a v případě větších orgánů by měly být odběry prováděny vždy ze stejného místa u všech zvířat.

Uskladnění tkání a DNA

36. Tkáně (nebo tkáňové homogenáty) by se měly skladovat při teplotě – 70 °C nebo nižší a pro izolaci DNA by se měly použít do pěti let. Izolovaná DNA uskladněná v chladničce při teplotě 4 °C ve vhodném pufru by se měla využít pro analýzu mutací optimálně do jednoho roku.

Výběr tkání pro analýzu mutací

37. Výběr tkání by měl vycházet z úvah jako: 1) způsob podání nebo místo prvního kontaktu (např. žláznatý žaludek, dochází-li k orální aplikaci, plíce, probíhá-li aplikace formou inhalace, nebo kůže, pokud byla použita místní aplikace); a 2) farmakokinetické parametry pozorované ve studiích obecné toxikologie, které ukazují na distribuci ve tkáních, retenci nebo akumulaci nebo cílové orgány pro toxicitu. Pokud jsou studie prováděny s cílem navázat na studie karcinogenity, měly by být zváženy cílové tkáně pro karcinogenitu. Výběr tkání pro analýzu by měl maximalizovat zjišťování účinků chemických látek, které jsou přímo působícími mutageny *in vitro*, které jsou rychle metabolizované, vysoce reaktivní nebo nedostatečně absorbované, nebo ty, pro které je cílová tkáň určena způsobem aplikace (6).

38. Nejsou-li k dispozici základní informace, a s přihlédnutím k místu kontaktu z důvodu způsobu aplikace by měla být mutagenita detekována v játrech a nejméně jedné rychle se dělící tkáni (např. žláznatý žaludek nebo kostní dřeň). Ve většině případů lze výše uvedených požadavků dosáhnout analýzou dvou pečlivě vybraných tkání, avšak někdy budou zapotřebí tři nebo více tkání. Existují-li důvody specifického zájmu o účinky na zárodečné buňky, včetně pozitivních výsledků získaných v somatických buňkách, pak měly být mutace zjišťovány i v zárodečných buňkách.

Metody měření

39. Pro doporučené transgenní modely jsou k dispozici standardní laboratorní nebo publikované metody pro zjišťování mutací: lambda bakteriofág a plazmid *lacZ* (30), myš *lacI* (2) (18), delta myš *gpt* (22), delta potkan *gpt* (28), *cII* (17). Modifikace by měly být odůvodněny a náležitě zdokumentovány. Lze agregovat a k dosažení vhodného počtu plaků nebo kolonií použít údaje z několika sbalení. Potřeba velkého počtu sbalování pro dosažení vhodného počtu plaků může být známkou nízké kvality DNA. V takových případech by údaje měly být brány v úvahu obezřetně, protože mohou být nespolehlivé. Optimální celkový počet plaků nebo kolonií na

▼M5

jeden vzorek DNA je upravován podle statistické pravděpodobnosti zjištění dostatečných počtů mutací při dané spontánní četnosti mutací. Obecně je požadováno minimálně 125 000 až 300 000 plaků, pokud spontánní četnost mutací je v řádu 3×10^{-5} (15). U zkoušky Big Blue® *lacI* je důležité prokázat, že celý rozsah barevných fenotypů mutací lze zjistit zahrnutím příslušných barevných kontrol souběžných s každým nanesením. Tkáně a výsledné vzorky (položky) by se měly zpracovávat a analyzovat pomocí blokového přístupu, kde jsou položky z kontrolní skupiny vehikulum/rozpouštědlo, ze skupiny pozitivní kontroly (je-li použita) nebo DNA pozitivní kontroly (je-li to relevantní) a z každé experimentální skupiny zpracovány společně.

ÚDAJE A ZPRÁVY

Zpracování výsledků

40. Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Protokol by měl obsahovat celkový počet jednotek tvořících plak (pfu) nebo jednotek tvořících kolonii (cfu), počet mutací a četnost mutací pro každou tkáň z každého zvířete. Pokud existuje více reakcí sbalování (*packaging/rescue reactions*), měl by být dokumentován počet reakcí na jeden vzorek DNA. Údaje o každé jednotlivé reakci by měly být archivovány, ve zprávě stačí uvádět pouze celkové počty pfu nebo cfu. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických známkách podle odstavce 34. Jakékoli výsledky sekvenování by měly být prezentovány pro každou analyzovanou mutaci a měly by být zobrazeny výsledné výpočty četnosti mutací pro každé zvíře a tkáň.

Statistické vyhodnocení a interpretace výsledků

41. Existuje několik kritérií pro určení pozitivního výsledku, jako je nárůst četnosti mutací v závislosti na dávce nebo jasný nárůst četnosti mutací v jedné exponované skupině v porovnání s kontrolní skupinou (rozpouštědlo/vehikulum). Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odpovědi, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny. Prvotní by měla být biologická relevance výsledků, vhodné statistické metody mohou být použity jako pomocné při hodnocení výsledků zkoušek (4) (14) (15) (25) (26). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

42. Zkoušená chemická látka, pro kterou výsledky nesplňují výše uvedená kritéria v žádné tkáni, je v této zkoušce považována za nemutagenní. Pro potvrzení biologického významu negativního výsledku by měla být prokázána expozice tkáně.

43. Pro výsledky získané sekvenováním DNA je k dispozici celá řada statistických přístupů, které jsou nápomocny při interpretaci výsledků (1) (5) (9) (19).

44. Při hodnocení biologického významu reakce může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (32).

▼M5

Závěrečná zpráva

45. Závěrečná zprávaby měla obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka:

— identifikační údaje a číslo CAS, je-li známo,

— zdroj, číslo šarže, je-li k dispozici,

— skupenství a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provedení studie,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace).

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

▼M5

— skutečná dávka (mg/kg tělesné hmotnosti na den) vypočítaná z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě/pitné vodě (ppm) a ze spotřeby, je-li to relevantní,

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— způsob utracení,

— postupy izolace a uchovávání tkání,

— metody izolace genomické DNA hlodavců, získání transgenu z genomické DNA a přenos transgenní DNA do bakteriálního hostitele,

— zdroje a čísla šarží všech buněk, sad a chemických činidel (je-li to relevantní),

— metody počítání mutací,

— metody molekulární analýzy mutací a použití při korekci pro klonalitu a/nebo výpočet četností mutací, jsou-li použitelné.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení,

— pro každou tkáň/zvíře počet mutací, počet hodnocených plaků nebo kolonií, četnost mutací,

— pro každou tkáň/skupinu zvířat počet reakcí sbalování na jeden vzorek DNA, celkový počet mutací, střední četnost mutací, směrodatná odchylka,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— pro každou tkáň/zvíře počet nezávislých mutací a střední četnost mutací, pokud byla provedena molekulární analýza mutací,

— souběžné a dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole (nebo nesouběžné pozitivní kontrole DNA),

— analytická stanovení, jsou-li k dispozici (např. koncentrace DNA použité při sbalování, údaje o sekvenování DNA),

— použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích

Závěr

▼**M5**

LITERATURA

1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.

3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659.

4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice*', Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 92: 7485–7489.

8) Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197–212.

9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA,* 86(20): 7971–7975.

11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.

13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), ‚Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 93(17): 9073–9078.

18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi ⁻ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, Nº19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, Nº 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, s. 391–410.

▼**M5**

31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, Nº 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.

34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Dodatek

DEFINICE

Bodová mutace: obecný výraz pro mutaci postihující pouze malou sekvenci DNA včetně malých insercí, delecí a substitucí základního páru.

Delece: mutace, ve které genom ztratil jeden nebo více (po sobě jdoucích) nukleotidů.

Doba odběru vzorků: konec období, před utracením, během kterého chemická látka není podávána a během kterého jsou nezpracované léze DNA fixovány do stálých mutací.

Doba podávání: celková doba, během níž jsou zvířeti podávány dávky.

Elektroporace: aplikace elektrických impulzů pro zvýšení propustnosti buněčných membrán.

Endogenní gen: vlastní gen genomu.

Extrabinomické rozdělení: větší variabilita při opakovaných odhadech podílu populace, než by se čekalo, pokud by populace měla binomické rozdělení.

Chemická látka: látka nebo směs.

Inserce: doplnění jednoho nebo více párů bází do sekvence DNA.

Jackpot: velký počet mutací, které vznikly klonální expanzí z jedné mutace.

Jednotka tvořící kolonii (cfu): míra počtu životaschopných bakterií.

Jednotka tvořící plak (pfu): míra počtu životaschopných bakteriofágů.

Kapsida: bílkovinné pouzdro, které obklopuje virovou částici.

Klonální expanze: produkce mnoha buněk z jedné (mutující) buňky.

Konkatemer: dlouhá spojitá biomolekula složená z mnoha identických kopií spojených do série.

Ligace: kovalentní vazba dvou konců molekul DNA pomocí ligázy DNA.

Místo cos: 12nukleotidový segment jednořetězcové DNA, který se vyskytuje na obou koncích dvouřetězcového genomu bakteriofágu lambda.

Mitogen: chemická látka, která stimuluje buňku k zahájení buněčného dělení, navozuje mitózu (tj. dělení buněk).

Neutrální gen: gen, který není dotčen tlaky pozitivní nebo negativní selekce.

Posunová mutace: genetická mutace způsobená insercemi nebo delecemi určitého počtu nukleotidů, již nelze rovnoměrně dělit třemi v rámci sekvence DNA, která udává kódy pro bílkovinu/peptid.

Pozitivní selekce: metoda, díky níž přežívají pouze mutace.

▼M5

Reporterový gen: gen, jehož mutace se snadno zjišťuje.

Sbalování (*packaging*): syntéza infekčních částic fágu z přípravy bílkovin kapsidy a konce fágu a konkatemeru molekul DNA fágu. Obvykle se používá ke sbalení DNA naklonované na lambda vektor (oddělený místy cos) do infekčních částic lambda.

Shuttle vektor: vektor sestavený tak, že se může množit ve dvou různých hostitelských druzích; v souladu s tím lze DNA vloženou do shuttle vektoru testovat nebo vmanipulovat do dvou různých typů buněk nebo dvou různých organizmů.

Substituce páru bází: typ mutace, který způsobuje nahrazení jedné nukleotidové báze DNA jinou nukleotidovou bází DNA.

Transgenní: patřící organismu, týkající se organismu nebo organismus, jehož genom byl změněn transferem genu nebo genů z jiných druhů.

Účinnost sbalování: účinnost, se kterou jsou sbalené bakteriofágy znovu zachycovány v hostitelských bakteriích.

Velké delece: delece v DNA o více než několika tisících bází (které se účinně zjistí při selekci Spi $^{-}$ a při zkouškách plazmidu lacZ).

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼B

ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY

OBSAH

C.1.	AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY
C.2.	ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNIÍ (*DAPHNIA* SP.)
C.3.	ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC
C.4.	STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI
ČÁST I.	OBECNÉ ÚVAHY
ČÁST II.	ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC (Metoda C.4-A)
ČÁST III.	MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD (Metoda C.4-B))
ČÁST IV.	ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO_2 (Metoda C.4-C)
ČÁST V.	ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ (Metoda C.4-D)
ČÁST VI.	ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (Metoda C.4-E)
ČÁST VII.	ZKOUŠKA MITI (Metoda C.4-F)
C.5.	ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
C.6.	ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
C.7.	ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH
C.8.	TOXICITA PRO ŽÍŽALY
C.9.	BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZAHN – WELLENSOVA ZKOUŠKA
C.10.	SIMULAČNÍ ZKOUŠKA AEROBNÍHO ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD: C.10-A: JEDNOTKY AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY
C.11.	BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZKOUŠKA NA INHIBICI DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU
C.12.	BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS
C.13.	BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH
C.14.	RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH
C.15.	ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU
C.16.	ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU
C.17.	VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY
C.18.	STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU

▼**B**

C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{OU}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

C.20. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI *DAPHNIA MAGNA*

C.21. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU

C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU

C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ

C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT

C.25 AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU

C.26 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU *LEMNA* SPP.

▼**M4**

C.27. TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉHO SEDIMENTU

C.28. TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT–VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY

C.29. HODNOCENÍ SNADNÉ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – UVOLŇOVÁNÍ CO_2 V TĚSNĚ UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (*HEADSPACE TEST*)

C.30. BIOAKUMULACE U TERESTRICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCŮ

▼B

C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY

1. METODA

1.1. ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Pro usnadnění výběru nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) s cílem zajistit dostatečně konstantní koncentrace zkoušené látky po celou dobu experimentu je žádoucí mít pokud možno k dispozici data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látce. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC_{50}), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg/l). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg.kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkoušené látky přidané do vody po dobu 96 hodin. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 hodin a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC_{50}).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jedna ryba, pokud se použije méně než deset ryb).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

▼B

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušky klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stálé roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které:

i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné nebo

ii) mohou vytvářet stálé emulze nebo disperse nebo

iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením zkušebních ryb.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než o 1.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Mohou být použity tři postupy:

Statická zkouška:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká. (Roztoky se během celé zkoušky nemění.)

Semistatická metoda:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích (např. po 24 hodinách) zcela vyměňován.

Průtoková metoda:

Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkoušená látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

1.6.1. **Činidla**

1.6.1.1. *Roztoky zkoušených látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkoušená koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředicí vodě.

▼B

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou P_{ow}, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícího okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní ryby. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg/l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistuji specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

1.6.1.2. *Voda pro chov ryb a ředění*

Může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (viz doplněk 1). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg/l (vztaženo na $CaCO_3$) a pH od 6,0 do 8,5.

1.6.2. **Přístroje**

Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:

— systém pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody,

— vhodný přístroj pro měření teploty,

— pH-metr.

1.6.3. **Testovací ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

▼B

Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoli další významné ekonomické a biologické faktory. Při výběru druhu ryb by měla být také zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace (1).

Seznam doporučených druhů ryb pro provedení této zkoušky je uveden v doplňku 2; dává se přednost druhům danio pruhované a pstruh duhový.

1.6.3.1. *Chov*

Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Ryby musí být chovány nejméně 12 dní v těchto podmínkách:

Obsádka:

Vhodná vzhledem k metodě (metoda s recirkulací nebo průtoková metoda) a druhu ryb.

Voda:

Viz 1.6.1.2.

Osvětlení:

Osvětlení 12 až 16 hodin denně.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku:

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem.

Krmení:

Třikrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 hodin před začátkem zkoušky.

1.6.3.2. *Mortalita*

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za 7 dní:

celá obsádka ryb se vyřadí,

— mortalita 5 až 10 % populace:

v chovu se pokračuje dalších 7 dní.

Nedojde-li k dalším případům úhynu, obsádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena,

— mortalita menší než 5 % populace:

obsádka je pro zkoušku použitelná.

1.6.4. **Aklimatizace**

Všechny ryby musí být nejméně na 7 dnů před použitím ve zkoušce nasazeny do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se použije při zkoušce.

▼B

1.6.5. **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkoušené látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria jakosti.

Ryby se exponují zkoušené látce za níže uvedených podmínek:

— délka expozice: 96 hodin,

— počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci,

— nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce,

— obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g/l; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka,

— zkušební koncentrace: nejméně pět koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %,

— voda: viz 1.6.1.2,

— osvětlení: osvětlení 12 až 16 hodin denně,

— teplota: podle druhu ryb (doplněk 2), avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ± 1 °C,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě,

— krmení: žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 až 4 hodinách a dále nejméně každých 24 hodin. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby se odstraní, jakmile jsou zpozorovány, a úhyn se zaznamená. Zaznamenají se všechny zjevné abnormality (např. ztráta rovnováhy, změny v plavání, chování, v dýchací funkci, v pigmentaci atd.).

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace 100 mg/l, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálou disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

▼B

Limitní zkouška se provede se 7 až 10 rybami a se stejným počtem ryb v kontrole (kontrolách). (Podle teorie binomického rozdělení je při použití 10 ryb a při nulové mortalitě 99,9 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než 100 mg/l. Při 7, 8 nebo 9 rybách znamená nulová mortalita nejméně 99 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.)

Dojde-li k úhynům, musí se provést celá studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24, 48, 72 a 96 hodin), vynese pro každou dobu expozice mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC_{50} a meze spolehlivost ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC_{50}, postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC_{50} nachází mezi těmito hodnotami.

Zjistí-li se, že není možné udržet stálost nebo homogenitu zkoušené látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zkušebních rybách (vědecký název, kmen, dodavatel, veškerá předchozí ošetření, velikost a počet ryb použitých při každé zkušební koncentraci),

— zdroj ředicí vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, tvrdost, teplota),

— u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků,

— koncentrace všech pomocných látek,

— přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stálosti zkoušené látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích,

— jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky,

— výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,

— důvody pro volbu použitého zkušebního postupu a podrobnosti o něm (např. statický, semistatický, dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována obsádka ryb atd.),

▼B

— popis zkušebního zařízení,

— světelný režim,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 hodin,

— důkaz, že byla splněna kritéria jakosti,

— tabulka kumulativních hodnot mortality při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování,

— graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky,

— podle možnosti hodnoty LC_{50} při každé z doporučených dob pozorování (při 95 % intervalu spolehlivosti),

— použité statistické metody stanovení hodnot LC_{50},

— při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,

— nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb,

— nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR -Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* -Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* -Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.

4) ISO 7346/1,/2 and/3 -Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7) JIS k 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15) Litchfield, J. T .and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17) Sprague, J .B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3–32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Doplněk 1

Upravená voda

Příklad vhodné ředicí vody

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 μS/cm.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky

$CaCl_2$. $2H_2O$ (chlorid vápenatý dihydrát)	11,76 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$MgSO_4$. $7H_2O$ (síran hořečnatý heptahydrát)	4,93 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný)	2,59 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
KCl (chlorid draselný)	0,23 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	

Upravená ředicí voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být 7,8 ± 0,2.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředicí voda se nechá 12 hodin stát a nemusí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je 2,5 mmol/l. Poměr množství iontů Ca: Mg je 4:1 a poměr množství iontů Na:k je 10:1. Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je 0,8 mmol/l.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

▼B

Doplněk 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušení

Doporučený druh	Doporučený rozsah teplot při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka ryb (cm)
Brachydanio rerio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque), střevle	20 až 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linneaus 1758), kapr obecný	20 až 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (*Teleostei, Poeciliidae*) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (Peters 1859), živorodka duhová	20 až 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei, Centrarchidae)* (Rafinesque Linneaus 1758), slunečnice modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (*Teleostei, Salmonidae*) (Walbaum 1988), pstruh duhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linneaus 1758), jelec jesen	20 až 24	6,0 ± 2,0

Opatřování ryb

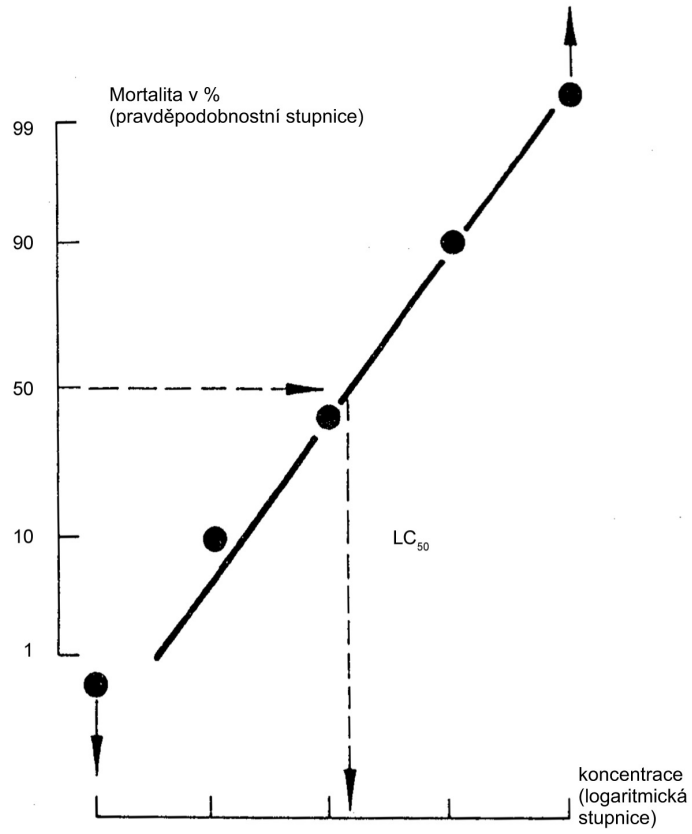
Ryby uvedené v seznamu se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

▼B

Doplněk 3

Příklad křivky závislosti mortality, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení LC_{50} na pravděpodobnostním logaritmickém papíru



▼B

C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNIÍ (*DAPHNIA* SP.)

1. METODA

Tato zkušební metoda akutní imobilizace je ekvivalentní testu OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Tato metoda popisuje zkoušku akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na dafnie. Stávající zkušební metody byly užity v největším možném rozsahu (1, 2, 3).

1.2. DEFINICE

V kontextu této metody jsou použity tyto definice:

EC_{50}: je koncentrace odhadnutá pro imobilizaci 50 % dafnií během stanovené expoziční doby. Je-li použita jiná definice, musí to být uvedeno spolu s příslušným odkazem.

Imobilizace: Dafnie neschopné plavat do 15 sekund po mírném zamíchání zkušební nádoby jsou pokládány za imobilizované (a to i když stále ještě mohou hýbat tykadly).

1.3. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé dafnie, staré méně než 24 hodin při zahájení zkoušky, jsou vystaveny zkoušené látce v určitém rozsahu koncentrací po dobu 48 hodin. Imobilizace je zaznamenána po 24 hodinách a po 48 hodinách a porovnána s kontrolními hodnotami. Výsledky jsou analyzovány s cílem vypočíst hodnotu EC_{50} po 48 hodinách (viz definici v oddílu 1.2). Stanovení hodnoty EC_{50} pro 24 hodin je volitelné.

1.4. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro zkoušenou látku by měla být známa rozpustnost ve vodě a tenze par a spolehlivá analytická metoda ke stanovení koncentrace dotyčné látky v zkoušeném roztoku s udanou účinností znovuzáchytu a měly by být dostupné meze stanovení. Užitečné údaje zahrnují strukturní vzorec, čistotu látky, stabilitu ve vodě nebo vůči světlu, rozdělovací koeficient P_{ow} a výsledky zkoušek snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

Poznámka: Návod pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v položce seznamu literatury (4).

1.5. REFERENČNÍ LÁTKY

Hodnoty EC_{50} pro referenční látky mohou být změřeny pro ověření, že zkušební podmínky jsou spolehlivé. K tomuto účelu jsou doporučeny toxické látky použité v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách (1, 5) ([1]). Zkoušky s referenčními látkami by měly být prováděny přednostně každý měsíc a nejméně dvakrát ročně.

([1]) Výsledky těchto mezilaboratorních zkoušek a technická oprava normy ISO 6341 udává EC_{50} – 24 hodin pro dvojchroman draselný ($K_2Cr_2O_7$) v rozmezí 0,6 mg/l až 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

Platnost zkoušky je podmíněna splněním následujících kritérií:

— při kontrolách, včetně kontroly zahrnující solubilizační činidlo, nesmí být imobilizováno více než 10 % dafnií,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky musí být ≥ 3 mg/l v kontrolní i ve zkušební nádobě.

Poznámka: Pro první kritérium smí být imobilizováno nebo vykazovat jiné známky choroby nebo stresu, např. odbarvení, neobvyklé chování jako např. zdržování se na povrchu vody, ne více než 10 % kontrolních dafnií.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. **Aparatura**

Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkoušenými roztoky, by měla být zhotovena ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami běžně budou skleněné zkumavky či kádinky; před každým použitím by měly být umyty standardními laboratorními postupy. Zkušební nádoby by měly být volně překryty ke snížení ztrát vody odparem a k předcházení vnikání prachu do roztoků. Těkavé látky by měly být zkoušeny v plně zaplněných a uzavřených nádobách dostatečně velkých k předcházení příliš nízkým nebo limitním koncentracím kyslíku (viz oddíl 1.6 nebo první odstavec oddílu 1.8.3).

Navíc budou použity některé nebo všechna následující zařízení: kyslíková sonda (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným čidlem pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku v nízkoobjemových vzorcích); pH-metr; dostatečný termostat; vybavení pro stanovení koncentrace celkového organického uhlíku (TOC), vybavení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (ChSK); vybavení pro stanovení tvrdosti atd.

1.7.2. **Zkušební organismy**

Preferovaným zkušebním druhem je *Daphnia magna* Straus, ačkoli v této zkoušce lze využívat i další druhy dafnií (např. *Daphnia pulex*). Na začátku zkoušky by dafnie měly být méně než 24 hodin staré a ke snížení rozptylu je silně doporučeno nepoužívat první generaci potomků. Dafnie by měly pocházet ze zdravého matečného rodu (tj. bez příznaků stresu, jako jsou vysoká úmrtnost, přítomnost samců nebo efipií (vajíček dafnií), zpoždění líhnutí prvních potomků, změna barvy organismů atd.). Všechny organismy použité konkrétní zkoušky by měly pocházet z kultur vypěstovaných ze stejného matečného rodu. Tento rod dafnií musí být chován v kultivačních podmínkách (světlo, teplota, médium) podobných podmínkám v použité zkoušce. Má-li být kultivační médium dafnií použité ve zkoušce odlišné od rutinního kultivačního média dafnií, je správnou praxí zařadit předzkouškové aklimatizační období. K tomuto účelu by generace dafnií měla být chována ve zřeďovací vodě při teplotě zkoušky, a to nejméně 48 hodin před začátkem zkoušky.

▼B

1.7.3. **Zásobní voda a zřeďovací voda**

Přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako zásobní a zřeďovací voda, pokud v ní dafnie přežijí po dobu kultivace, aklimatizace a zkoušení bez známek stresu. Jako zkušební voda je přijatelná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým vlastnostem přijatelných zřeďovacích vod uvedeným v dodatku 1. Měla by mít stálou jakost během doby zkoušení. Rekonstituovaná voda může být připravena přídavkem určitého množství reagencií uznané analytické čistoty k deionizované nebo destilované vodě. Příklady rekonstituované vody jsou uvedeny v položkách seznamu literatury (1, 6) a v dodatku 2. Důležité je, že média obsahující známá chelatační činidla, např. média M4 a M7 uvedená v dodatku 2, by měla být vyloučena ze zkoušení látek obsahujících kovy. Hodnoty pH by měly ležet v rozmezí 6 až 9. Pro *Daphnia magna* je doporučena tvrdost mezi 140 a 250 mg/l (jako $CaCO_3$), zatímco pro jiné druhy dafnií může být vhodná nižší tvrdost. Zřeďovací voda může být před zkouškou provzdušňována tak, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku dosáhla koncentrace nasycení.

Je-li použita přírodní voda, parametry jakosti by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně nebo kdykoli vznikne podezření, že se tyto parametry mohly významně změnit (viz předchozí odstavec a dodatek 1). Rovněž by mělo být provedeno stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Je-li použita odchlorovaná vodovodní voda, je žádoucí každodenní analýza chloru. Pochází-li zřeďovací voda ze zdrojů povrchových nebo podzemních vod, měla by být stanovena vodivost a celkový organický uhlík (TOC) nebo chemická spotřeba kyslíku (ChSK).

1.7.4. **Zkoušené roztoky**

Zkoušené roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připraveny ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně rozpuštěním zkoušené látky ve zřeďovací vodě. Používání rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel by mělo být podle možností vyloučeno. V některých případech však mohou být takováto činidla nutná k přípravě vhodně koncentrovaného zásobního roztoku. Pokyny k výběru vhodných rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel jsou uvedeny v položce seznamu literatury (4). V žádném případě by koncentrace zkoušené látky ve zkoušených roztocích neměla překročit rozpustnost ve zřeďovací vodě.

Zkouška by měla být provedena bez úpravy pH. Nezůstane-li pH v rozmezí 6–9, lze provést druhou zkoušku s upraveným pH zásobního roztoku na hodnotu pH zřeďovací vody před přidáním zkoušené látky. Hodnota pH zásobního roztoku by měla být upravena tak, aby se koncentrace zásobního roztoku významně nezměnila a aby nedošlo k žádné chemické reakci se zkoušenou látkou nebo k jejímu vysrážení. Upřednostněny jsou HCl a NaOH.

▼B

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmínky expozice**

1.8.1.1. *Zkoušené skupiny a kontroly*

Zkušební nádoby jsou naplněny vhodným objemem zřeďovací vody a roztoku zkoušené látky. Poměr objemů vzduchu a vody v nádobě by měl být stejný pro zkušební i kontrolní skupinu. Dafnie jsou pak vneseny do zkušební nádoby. Pro každou zkoušenou koncentraci a pro kontroly by mělo být užito přinejmenším 20 organismů, přednostně rozdělených do čtyř skupin s pěti organismy v každé skupině. Na každý organismus by mělo být dáno nejméně 2 ml zkoušeného roztoku (tj. objem 10 ml pro pět dafnií ve zkušební nádobě). Zkouška může proběhnout semistaticky doplňováním roztoku nebo v průtočném systému, pokud koncentrace zkoušené látky není stabilní.

Navíc k expoziční řadě musí být provedena jedna řada kontrol zřeďovací vody, a je-li to relevantní, tak též kontrolní řada obsahující solubilizační činidlo.

1.8.1.2. *Zkušební koncentrace*

Nejsou-li dostupné údaje o toxicitě zkoušené látky, lze rozsah koncentrací konečné zkoušky stanovit testem pro stanovení rozsahu. K tomuto účelu jsou dafnie exponovány řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené látky. Každé zkušební koncentraci by mělo být exponováno pět dafnií po dobu 48 hodin nebo méně, replikace nejsou zapotřebí. Expoziční dobu lze zkrátit (např. na 24 hodin nebo méně), lze-li vhodné údaje pro test ke stanovení rozsahu získat v kratší době.

Mělo by být použito nejméně pět zkušebních koncentrací. Ty by měly tvořit geometrickou řadu s dělícím faktorem přednostně nepřesahujícím 2,2. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla přednostně vést ke 100 % imobilizaci, a nejnižší zkoušená koncentrace by neměla mít žádné pozorovatelné účinky.

1.8.1.3. *Inkubační podmínky*

Teplota by měla být v rozsahu 18 °C až 22 °C, a v každé jednotlivé zkoušce by měla být konstantní v rozpětí ± 1 °C. Doporučen je cyklus 16 hodin světla a 8 hodin temna. Úplná tma je rovněž přijatelná, zejména pro zkoušené látky nestabilní na světle.

Zkušební nádoby nesmí být během zkoušky provzdušňovány. Zkouška probíhá bez úpravy hodnot pH. Během zkoušky by dafnie neměly být krmeny.

1.8.1.4. *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky je 48 hodin.

1.8.2. **Pozorování**

V každé zkušební nádobě by měl být zkontrolován počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách po zahájení zkoušky (viz definice v oddílu 1.2). Kromě imobilizace by mělo být uvedeno jakékoli nestandardní chování nebo vzhled.

▼B

1.8.3. **Analytická měření**

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH jsou měřeny na počátku a na konci zkoušky v kontrolách a u zkoušky při nejvyšší koncentraci zkoušené látky. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v kontrolách by měla odpovídat kritériu platnosti (viz oddíl 1.6). Hodnota pH by se neměla standardně v žádné zkoušce změnit o více než 1,5 jednotky. Teplota je obvykle měřena v kontrolních nádobách nebo v okolním ovzduší a měla by být registrována nejlépe nepřetržitě během zkoušky, nebo alespoň na začátku a na konci zkoušky.

Koncentrace zkoušené látky by měla být měřena alespoň při nejvyšší a nejnižší zkoušené koncentraci na začátku a na konci zkoušky (4). Doporučeno je výsledky zakládat na měřených koncentracích. Jsou-li však dostupné důkazy prokazující, že během zkoušky byly koncentrace zkoušené látky uspokojivě udrženy s přesností ± 20 % jmenovité koncentrace nebo z počáteční naměřené koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo počátečních změřených hodnotách.

1.9. MEZNÍ ZKOUŠKA

Mezní zkouška může být provedena postupy popsanými v této metodě při koncentraci zkoušené látky 100 mg/l nebo až při její mezní rozpustnosti ve zkoušeném médiu s cílem prokázat, že hodnota EC_{50} je vyšší než tato koncentrace. Mezní zkouška by měla být provedena s 20 dafniemi (přednostně rozdělenými do čtyř skupin po pěti organismech) se stejným počtem v kontrole či v kontrolách. Dojde-li k jakékoli imobilizaci, měla by být provedena úplná studie. Pozorované nestandardní chování by mělo být zaznamenáno.

2. **ÚDAJE**

Údaje by měly být shrnuty v tabulkách, uvádějících pro každou exponovanou skupinu a kontrolu počet použitých a z toho imobilizovaných dafnií pro všechna pozorování. Procentní podíl imobilizovaných dafnií za 24 hodin a za 48 hodin je vynesen proti zkoušeným koncentracím. Údaje jsou analyzovány vhodnými statistickými metodami (např. probit analýzou atd.) k výpočtu směrnice dotyčné křivky dávka – odezva a hodnot EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti ($p = 0,05$) (7, 8).

Nelze-li ze získaných údajů vypočíst EC_{50} standardními metodami, měla by být hodnota EC_{50} aproximována jako geometrická střední hodnota z nejvyšší koncentrace nezpůsobující žádnou imobilizaci a nejnižší koncentrace způsobující 100 % imobilitu.

3. **ZPRÁVY**

3.1. ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí obsahovat toto:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼B

— chemické identifikační údaje včetně čistoty.

Zkušební druhy:

— zdroj a druhy dafnií *Daphnia*, dodavatel zdroje (je-li znám) a použité kultivační podmínky (včetně zdroje, druhu a množství potravy a frekvence krmení).

Zkušební podmínky:

— popis zkušební nádoby: typ nádoby, objem roztoku, počet dafnií ve zkušební nádobě, počet zkušebních nádob (replikací) při dané koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkoušených roztoků včetně použití jakýchkoli rozpouštědel nebo dispergačních činidel, použité koncentrace,

— podrobné údaje o zřeďovací vodě: zdroj a charakteristiky jakosti vody (pH, tvrdost, poměr Ca/Mg a Na/K, alkalita, vodivost atd.); složení rekonstituované vody, je-li použita,

— inkubační podmínky: teplota, intenzita a periodicita světla, koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH atd.

Výsledky:

— počet a procentní podíl dafnií imobilizovaných nebo vykazujících nepříznivé účinky (včetně nestandardního chování) v kontrolách a v každé exponované skupině, v každém pozorovacím čase a popis povahy pozorovaných účinků,

— výsledky a datum zkoušky provedené s referenční látkou, jsou-li dostupné,

— jmenovité zkoušené koncentrace a výsledky všech analýz ke stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách; regenerační účinnost metody a mez stanovení by rovněž měla být uvedena,

— veškerá fyzikálně-chemická měření teploty, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku provedená během zkoušky,

— hodnoty EC_{50} po 48 hodinách pro imobilizaci s uvedením intervalu spolehlivosti a grafů proloženého modelu použitého pro jejich výpočet, směrnice křivek dávka – odezva a jejich standardní odchylka; statistické postupy použité ke stanovení hodnoty EC_{50} (pokud byly měřeny tyto datové položky i pro 24 hodin, měly by být rovněž uvedeny),

— vysvětlení jakýchkoli odchylek od této zkušební metody a případné ovlivnění výsledků těmito odchylkami.

4. **LITERATURA**

1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. s. 65–84.

8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

DODATEK 1

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ZŘEĎOVACÍ VODY

Látka	Koncentrace
Hmotné částice (prach)	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorované pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organicky vázaný chlor	< 25 ng/l

▼B

DODATEK 2

PŘÍKLADY VHODNÉ REKONSTITUOVANÉ ZKUŠEBNÍ VODY

Zkušební voda ISO (1)

Zásobní roztok (jednotlivé látky)		K přípravě rekonstituované vody přidejte následující objem zásobních roztoků k 1 litru vody (*)
Látka	Navážka přidaná k 1 litru vody (*)	
Chlorid vápenatý $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Síran hořečnatý $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Hydrouhličitan sodný $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda vhodné čistoty, např. deionizovaná, destilovaná nebo čištěná reversní osmosou s vodivostí nepřesahující 10 μS/cm.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizace na Elendtova média M4 a M7

V některých laboratořích nastaly potíže s přímým vnášením dafnií do médií M4 a M7. Určitý úspěch však byl dosažen postupnou aklimatizací, tj. s předáním z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Potřebné délky dob aklimatizace mohou být až měsíc.

Příprava

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reversní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. Z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ $4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼B

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Jak roztok Na 2 EDTA, tak roztok $FeSO_4$ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávují.

Získají se:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000	20,0	5,0

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobní roztok II (obsahující kombinaci stopových prvků)		20	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2 $SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

▼B

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:				
Thiamin-hydrochlorid	750	10 000		
Kyanokobalamin (B_{12})	10	10 000		
Biotin	7,5	10 000		

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uchovává v malých zmrazených podílech. Vitaminy se přidají do média krátce před použitím.

Poznámka: Vysrážení solí při přípravě kompletního média se zabrání přidáním podílů zásobních roztoků do přibližně 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámka: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M1

C.3 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 201 (2006) (1).

1.1 ÚVOD

Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají a aktualizují s ohledem na vědecký pokrok. Zkušební metoda C.3 musela být přepracována tak, aby zahrnovala další druhy a splňovala požadavky na hodnocení nebezpečnosti a klasifikace chemických látek. Přepracování bylo dokončeno na základě rozsáhlých praktických zkušeností, vědeckého pokroku na poli studií toxicity řas a širokého uplatňování příslušných právních předpisů od přijetí původního znění.

1.2 DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa: je suchá hmotnost živé hmoty přítomné v populaci vyjádřená ve vztahu k danému objemu; např. mg řas/litr zkušebního roztoku. „Biomasa“ je obvykle definována jako hmota, ale v rámci této zkoušky se toto slovo používá pro hmotu vztaženou na objem. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet buněk, fluorescence atd., a používání termínu „biomasa“ tedy odkazuje na tyto náhradní míry.

Variační koeficient: je bezrozměrná veličina proměnlivosti parametru, definovaná jako poměr směrodatné odchylky a střední hodnoty. Lze jej rovněž vyjádřit jako procentuální údaj. Střední variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti v kontrolních kulturách použitých k opakování se vypočítává následovně:

1) Vypočítejte % variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti z denních růstových rychlostí nebo růstových rychlostí po jednotlivých časových úsecích pro příslušné opakování.

2) Vypočítejte střední hodnotu ze všech hodnot vypočítaných v bodě 1 pro získání středního variačního koeficientu denní specifické růstové rychlosti nebo specifické růstové rychlosti po jednotlivých časových úsecích v kontrolních kulturách použitých k opakování.

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x% (např. 50 %) snížení růstu testovacího organismu (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky). Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se v příslušných případech používají symboly „E_rC“ a „E_yC“.

Růstové médium: je úplné syntetické kultivační médium, v němž rostou zkušební řasy při expozici zkoušené látce. Zkoušená látka bude za normálních podmínek ve zkušebním médiu rozpuštěna.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost): je logaritmické zvýšení biomasy během období expozice.

▼M1

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): je nejnižší zkušební koncentrací, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (No Observed Effect Concentration, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Proměnná odezvy: je proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených parametrů, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují přímo z měření biomasy nebo jakékoliv z uvedených náhrad.

Specifická růstová rychlost: je proměnná odezvy definovaná jako kvocient rozdílu přirozených logaritmů sledovaného parametru (v této zkušební metodě je jím biomasa) a příslušného časového období.

Výtěžek: je hodnota proměnné měření na konci expoziční doby minus hodnota proměnné měření na počátku expoziční doby pro vyjádření nárůstu biomasy během zkoušky.

1.3 POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato zkušební metoda se nejsnadněji používá pro látky rozpustné ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně ve vodě zůstanou. Pro zkoušení látek, které jsou těkavé, silně adsorbují, jsou zbarvené, mají nízkou rozpustnost ve vodě, nebo látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat dostupnost živin či minerálů ve zkušebním médiu, mohou být potřebné určité úpravy popsaného postupu (např. uzavřený systém, klimatizace zkušebních nádob). Pokyny k některým vhodným úpravám jsou uvedeny v literatuře (2, 3 a 4).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Účelem této zkoušky je stanovit účinek látky na růst sladkovodních mikrořas a/nebo sinic. Exponenciálně rostoucí testovací organismy jsou vystaveny zkoušené látce v dávkových kulturách obvykle po dobu 72 hodin. Navzdory relativně krátké době trvání zkoušky lze posoudit účinky na několik generací.

Systémovou odezvou je snížení růstu v řadě kultur řas (zkušebních jednotek) vystavených různým koncentracím zkoušené látky. Odezva se vyhodnocuje jako funkce expoziční koncentrace v porovnání s průměrným růstem neexponovaných kontrolních kultur použitých k opakování. Pro plné vyjádření systémové odezvy na toxické účinky (optimální citlivost) se kultury ponechají růst exponenciálně bez omezení za dostatečných vyživovacích podmínek a nepřetržitého osvětlení po dostatečnou dobu, aby bylo možné změřit snížení specifické růstové rychlosti.

▼M1

Růst a inhibice růstu se kvantifikují měřeními biomasy řas jakožto funkce času. Biomasa řas se definuje jako suchá hmotnost na objem, např. mg řas/litr zkušebního roztoku. Ovšem suchá hmotnost se měří obtížně, proto se používají náhradní parametry. Z těchto náhrad se nejčastěji používají počty buněk. Mezi další náhradní parametry patří buněčný objem, fluorescence, optická hustota atd. Je třeba znát přepočítávací faktor mezi naměřeným náhradním parametrem a biomasou.

Zkoumaným účinkem je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení biomasy (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

Při použití této metody v rámci práva EU by měl být výpočet výsledků založen na průměrné specifické růstové rychlosti, a to z důvodů uvedených v bodě 2.2. Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nutný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako biomasa na konci expoziční doby minus biomasa na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. E_yC_{50}).

Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota, stálost na světle, stálost v podmínkách zkoušky, vlastnosti světelné absorpce, pK_a a výsledky studií transformace včetně biologické rozložitelnosti ve vodě.

Měly by být známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě, její rozdělovací koeficient oktanol/voda ($P_{o/v}$) a tlak jejích par a měla by být k dispozici validovaná metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženou výtěžností a mezí detekce.

1.6 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní kroužkové zkoušce (4). Dichroman draselný lze rovněž použít jako referenční látku pro zelené řasy. Je žádoucí zkoušet referenční látku nejméně dvakrát ročně.

1.7 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

▼M1

— Biomasa by se měla v kontrolních kulturách během 72hodinové zkušební doby zvýšit exponenciálně, a to nejméně šestnáctkrát. To odpovídá specifické růstové rychlosti 0,92 den^{-1}. U nejčastěji používaných druhů je obvykle růstová rychlost výrazně vyšší (viz dodatek 1). Může se stát, že se toto kritérium nesplní, pokud se používají druhy, které rostou pomaleji než druhy uvedené na seznamu v dodatku 1. V takovém případě je třeba prodloužit zkušební dobu, aby bylo dosaženo nejméně šestnáctinásobného růstu kontrolních kultur, přičemž růst musí být během zkušebního období exponenciální. Zkušební dobu lze zkrátit až na minimální dobu 48 hodin, aby se během zkoušky udržel neomezený exponenciální růst, pokud bude dosaženo minimálního násobícího koeficientu 16.

— Střední variační koeficient pro specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích (dny 0–1, 1–2 a 2–3 při 72hodinové zkoušce) v kontrolních kulturách (viz bod 1.2 odstavec „variační koeficient“) nesmí překročit 35 %. Pro výpočet specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích viz bod 2.2.1 druhý odstavec. Toto kritérium platí pro střední hodnotu variačních koeficientů vypočítaných pro kontrolní kultury použité k opakování.

— Variační koeficient průměrných specifických růstových rychlostí během celého zkušebního období u kontrolních kultur použitých k opakování nesmí překročit 7 % u zkoušek s *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. U jiných méně často zkoušených druhů by hodnota neměla překročit 10 %.

1.8 POPIS METODY

1.8.1 **Přístroje a pomůcky**

Zkušební nádoby a jiné přístroje a pomůcky, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být celoskleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Jednotlivé díly je zapotřebí důkladně vymýt, aby bylo zajištěno, že žádné organické ani anorganické nečistoty nebudou moci narušovat růst řas nebo složení zkušebních roztoků.

Zkušebními nádobami budou za normálních podmínek skleněné baňky takových rozměrů, aby pojaly dostatečný objem kultury pro měření během zkoušky a umožnily dostatečný hmotnostní přenos CO_2 z atmosféry (viz bod 1.8.9 druhý odstavec). Je třeba mít na paměti, že objem kapaliny musí být dostačující pro analytická stanovení (viz bod 1.8.11 pátý odstavec).

Kromě toho bude potřebné veškeré následující vybavení nebo jeho část:

— Kultivační zařízení: doporučuje se místnost nebo komora, v níž lze udržovat zvolenou inkubační teplotu na ±2 °C.

— Přístroje na měření světla: je důležité mít na paměti, že metoda měření intenzity světla a zejména typ snímače (kolektoru) ovlivní naměřenou hodnotu. Měření by se mělo nejlépe provádět pomocí kulového (4 π) snímače (reaguje na přímé a odražené světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření), nebo 2 π snímače (reaguje na světlo ze všech úhlů nad rovinou měření).

▼M1

— Zařízení pro stanovení biomasy řas. Počet buněk, který je nejčastěji používaným náhradním parametrem pro biomasu řas, lze určit pomocí elektronického počítače částic, mikroskopu s počítací komůrkou nebo průtokovým cytometrem. Další náhrady biomasy lze měřit průtokovým cytometrem, fluorimetrem, spektrofotometrem nebo kolorimetrem. Je užitečné vypočítat faktor pro konverzi počtu buněk na suchou hmotnost. Aby bylo možné zajistit užitečná měření při nízkých koncentracích biomasy při použití spektrofotometru, může vzniknout nutnost používat kyvety s dráhou světla nejméně 4 cm.

1.8.2 **Testovací organismy**

Lze použít několik druhů nevázaných mikrořas a sinic. Kmeny uvedené v dodatku 1 se ukázaly jako vhodné na základě zkušebního postupu uvedeného v této zkušební metodě.

Jestliže se použijí jiné druhy, je třeba uvést ve zprávě kmen a/nebo původ. Musí se potvrdit, že lze udržovat exponenciální růst vybraných zkušebních řas po zkušební dobu za převažujících podmínek.

1.8.3 **Růstové médium**

Doporučují se dvě alternativní růstová média, médium OECD a AAP. Složení těchto médií je uvedeno v dodatku 2. Je třeba mít na paměti, že počáteční hodnota pH a kapacita pufru (regulující zvýšení pH) těchto dvou médií jsou odlišné. Proto mohou být výsledky zkoušek odlišné v závislosti na použitém médiu, zejména při zkoušení ionizujících látek.

Pro určité účely může být nezbytná úprava růstových médií, např. když se zkouší kovy a chelátotvorná činidla nebo se provádí zkoušky při různých hodnotách pH. Použití upraveného média musí být podrobně popsáno a zdůvodněno (3, 4).

1.8.4 **Počáteční koncentrace biomasy**

Počáteční biomasa musí být stejná ve všech zkušebních kulturách a dostatečně nízká, aby umožňovala exponenciální růst po celou inkubační dobu bez rizika vyčerpání živin. Počáteční biomasa by neměla překročit 0,5 mg/l suché hmotnosti. Doporučují se následující počáteční koncentrace buněk:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3–10^4	buněk/ml
Desmodesmus subspicatus	2–5×10^3	buněk/ml
Navicula pelliculosa	10^4	buněk/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	buněk/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4–10^5	buněk/ml

1.8.5 **Koncentrace zkoušené látky**

Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, lze určit na základě výsledků orientačních zkoušek. Pro závěrečnou definitivní zkoušku je zapotřebí vybrat alespoň pět koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2. U zkušebních látek vykazujících plochou křivku závislosti odezvy na koncentraci může být opodstatněný vyšší faktor. Řady koncentrací by nejlépe měly pokrývat rozmezí způsobující 5–75 % inhibici růstové rychlosti řas.

▼M1

1.8.6 **Opakování a kontroly**

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací. Jestliže se stanovení NOEC nepožaduje, plán zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet opakování na příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování musí být nejméně tři a v ideálním případě by měl být dvojnásobkem počtu opakování používaných pro každou zkušební koncentraci.

Pro analytická stanovení koncentrací zkušební látky lze připravit samostatnou sadu zkušebních roztoků (viz bod 1.8.11 čtvrtý a šestý odstavec).

Pokud se k rozpouštění zkoušené látky používá rozpouštědlo, musí být do plánu zkoušky zahrnuty dodatečné kontroly obsahující rozpouštědlo o stejné koncentraci, jaká se používá ve zkušebních kulturách.

1.8.7 **Příprava očkovací kultury**

K přizpůsobení zkušebních řas na podmínky zkoušky a zajištění toho, aby řasy byly v exponenciální růstové fázi, když se použijí pro naočkování zkušebních roztoků, se očkovací kultura připravuje ve zkušebním médiu 2 až 4 dny před zahájením zkoušky. Biomasu řas je třeba upravit, aby mohl v očkovací kultuře převážit do zahájení zkoušky exponenciální růst. Očkovací kultura se musí inkubovat za stejných podmínek jako zkušební kultury. Měřte nárůst biomasy v očkovací kultuře, aby bylo zajištěno, že je růst v rámci normálního rozmezí pro zkušební kmen za podmínek kultivace. Příklad postupu pro kultivaci řas je popsán v dodatku 3. Aby se zabránilo synchronnímu dělení buněk během zkoušky, může být potřebné provést druhý krok propagace očkovací kultury.

1.8.8 **Příprava zkušebních roztoků**

Všechny zkušební roztoky musí obsahovat stejné koncentrace růstového média a počáteční biomasy zkušebních řas. Zkušební roztoky zvolených koncentrací se obvykle připravují smísením zásobního roztoku zkoušené látky s růstovým médiem a očkovací kulturou. Zásobní roztoky se obyčejně připravují rozpuštěním látky ve zkušebním médiu.

Jako nosiče pro přidávání látek o nízké rozpustnosti ve vodě do zkušebního média mohou být použita rozpouštědla, např. aceton, *terc*-butylalkohol a dimethylformamid (2, 3). Koncentrace rozpouštědla by neměla překročit 100 µl/l a do všech kultur (včetně kontrol) ve zkušební řadě by měla být přidána stejná koncentrace rozpouštědla.

1.8.9 **Inkubace**

Zakryjte zkušební nádoby zátkami, které propouští vzduch. Nádoby se protřepou a umístí se do kultivačního zařízení. Během zkoušky je nezbytné udržovat řasy v suspensi a umožnit přenos CO_2. Za tímto účelem je třeba provádět nepřetržité třepání nebo míchání. Kultury se udržují při teplotě 21–24 °C udržované s přesností na ±2 °C. U jiných druhů, než jsou druhy uvedené v seznamu v dodatku 1, např. u tropických druhů, mohou být vhodné vyšší teploty, pokud lze ovšem splnit kritéria validity. Doporučuje se umísťovat baňky náhodně a denně je v inkubátoru přemísťovat.

▼M1

Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. U kovů a sloučenin, které částečně ionizují při pH okolo pH zkoušky může být nezbytné omezit posun pH pro získání reprodukovatelných a dobře definovaných výsledků. Posun o < 0,5 pH je technicky proveditelný a lze jej dosáhnout zajištěním adekvátní rychlosti přesunu hmoty CO_2 z okolního vzduchu do zkušebního roztoku, např. zvýšením rychlosti třepání. Další možností je snížit potřebu CO_2 snížením počáteční biomasy nebo doby trvání zkoušky.

Povrch, kde jsou kultury inkubovány, by měl být trvale osvětlen jednotným fluorescenčním světlem, např. „chladným bílým“ nebo „denním“ světlem. Jednotlivé kmeny řas a sinic mají různé požadavky na osvětlení. Intenzita světla by měla být zvolena tak, aby vyhovovala použitému testovacímu organismu. Pro doporučené druhy zelených řas se intenzita světla na úrovni zkušebních roztoků zvolí v rozmezí 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, přičemž se měří ve fotosynteticky efektivním rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm pomocí vhodného snímače. Některé druhy, zejména *Anabaena flos-aquae*, dobře rostou při nízkých intenzitách osvětlení a mohou být při vysokých intenzitách poškozeny. U takových druhů by měla být zvolena průměrná intenzita světla 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Měří-li se intenzita luxmetry, ekvivalentní rozpětí 4 440 až 8 880 luxů pro chladné bílé světlo odpovídá přibližně doporučené světelné intenzitě 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Intenzita světla se nesmí lišit o více než ±15 % od průměrné intenzity světla nad plochou inkubace.

1.8.10 **Doba trvání zkoušky**

Zkouška obvykle trvá 72 hodin. Lze však použít kratších nebo delších dob trvání zkoušky, pokud lze splnit všechna kritéria validity uvedená v bodě 1.7.

1.8.11 **Měření a analytická stanovení**

Biomasa řas se během doby zkoušky určí v každé baňce nejméně jednou denně. Jestliže se měření provádí na malých objemech vyjmutých ze zkušebního roztoku pipetou, neměly by se nahrazovat.

Měření biomasy se provádí ručním počítáním buněk pod mikroskopem nebo pomocí elektronického počítače částic (počty buněk a/nebo biologický objem). Alternativní techniky, např. průtoková cytometrie, fluorescence chlorofylu *in vitro* nebo *in vivo* (6, 7) nebo optická hustota, lze použít za předpokladu, že je možné prokázat uspokojivou korelaci s biomasou v rozmezí, v němž se biomasa během zkoušky vyskytuje.

pH roztoků se měří na počátku a na konci zkoušky.

Pokud je dostupný analytický postup k určení zkoušené látky v rozmezí použitých koncentrací, zkušební roztoky je třeba analyzovat, aby se ověřily počáteční koncentrace a udržení expozičních koncentrací během zkoušky.

▼M1

Analýza koncentrace zkoušené látky na počátku a konci zkoušky při nízké a vysoké zkušební koncentraci a koncentrace okolo očekávané EC_{50} mohou dostačovat, jestliže je pravděpodobné, že se budou během zkoušky expoziční koncentrace lišit o méně než 20 % od nominálních hodnot. Analýza všech zkušebních koncentrací na počátku a konci zkoušky se doporučuje v případě, kdy je nepravděpodobné, že koncentrace zůstanou v rozmezí 80 až 120 % nominální hodnoty. U těkavých, nestabilních nebo silně adsorbujících zkoušených látek se doporučuje provést dodatečný odběr vzorků k analýze v 24hodinových intervalech během expoziční doby s cílem lépe definovat ztrátu zkoušené látky. U těchto látek jsou zapotřebí dodatečná opakování. Ve všech případech je třeba provést určení koncentrací zkoušené látky při každé zkušební koncentraci pouze u jedné nádoby k opakování (nebo u sdruženého obsahu nádob jednoho opakování).

Zkušební média specificky připravená k analýze expozičních koncentrací během zkoušky by měla být exponována stejným způsobem jako zkušební média použitá ke zkoušení, tj. měla by být naočkována řasami a inkubována za identických podmínek. Jestliže se požaduje analýza koncentrace rozpuštěné zkušební látky, může být nezbytné oddělit řasy od média. Oddělení by se mělo nejlépe provádět odstřeďováním při nízké síle *g* dostatečné pro usazení řas.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ±20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ±20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené látky (3, 8).

Zkouška inhibice růstu řas je dynamičtější zkušební systém než většina jiných krátkodobých zkoušek vodní toxicity. V důsledku toho může být obtížné definovat skutečné expoziční koncentrace, zvláště u adsorbujících látek zkoušených při nízkých koncentracích. V takových případech vymizení látky z roztoku adsorpcí do zvyšující se biomasy řas neznamená, že se ztratila ze zkušebního systému. Při analýze výsledku zkoušky je třeba zkontrolovat, zda-li je pokles koncentrace zkoušené látky v průběhu zkoušky doprovázen poklesem inhibice růstu. Pokud tomu tak je, lze zvážit použití vhodného modelu popisujícího pokles koncentrace zkoušené látky (8). Pokud tomu tak není, může být vhodné založit analýzu výsledků na počátečních (nominálních či naměřených) koncentracích.

1.8.12 **Další pozorování**

Pro ověření normálního a zdravého vzhledu očkovací kultury a sledování jakéhokoliv abnormálního vzhledu řas (které může být způsobeno expozicí zkoušené látce) na konci zkoušky by mělo být provedeno mikroskopické pozorování.

▼M1

1.8.13 **Limitní zkouška**

Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg l^{-1} nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může být provedena limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg l^{-1} nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria validity se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že by mělo být provedeno alespoň šest opakování s exponovanými vzorky. Proměnné odezvy v kontrolní a exponované skupině mohou být analyzovány pomocí statistického testu pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu. Jestliže rozptyly obou skupin nejsou shodné, je třeba provést t-test upravený pro rozdílné rozptyly.

1.8.14 **Úprava pro intenzivně zbarvené látky**

Ozářenost (intenzita světla) by měla dosahovat hodnot na nejvyšším konci rozsahu předepsaného v této zkušební metodě: 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ nebo více.

Dráha světla by měla být zkrácena snížením objemu zkušebních roztoků (v rozmezí 5–25 ml).

Je nezbytné dostatečné míchání (například mírným protřepáváním), aby bylo dosaženo vysoké frekvence expozice řas vysoké ozářenosti na povrchu kultury.

2. **DATA**

2.1 VYNÁŠENÍ RŮSTOVÝCH KŘIVEK

Biomasa ve zkušebních nádobách může být vyjádřena v jednotkách náhradního parametru použitého pro měření (např. počet buněk, fluorescence).

Pro vynesení růstových křivek do grafu sestavte tabulku odhadovaných koncentrací biomasy ve zkušebních kulturách a kontrolách společně s koncentracemi zkušebního materiálu a časy měření zaznamenanými v rozlišení nejméně na celé hodiny. V tomto prvním stadiu mohou být užitečné jak logaritmické, tak lineární stupnice, ale logaritmické stupnice jsou povinné a obecně poskytují lepší zobrazení odchylek ve vzorci růstu během zkušebního období. Nezapomeňte, že exponenciální růst má při vynesení na logaritmické stupnici podobu přímky a že sklon (směrnice) přímky ukazuje specifickou růstovou rychlost.

Po vynesení prověřte, zda-li rostou kontrolní kultury exponenciálně očekávanou rychlostí po celou dobu zkoušky. Kriticky zhodnoťte všechny datové body a vzhled grafů a zkontrolujte, zda v hrubých datech a postupech nejsou chyby. Zejména zkontrolujte všechny datové body, u nichž se zdá, že se odchylují na základě systematické chyby. Pokud je zřejmé, že lze rozpoznat procesní chyby a/nebo je lze považovat za vysoce pravděpodobné, specifický datový bod se označí jako odlehlá hodnota a nebude zahrnut do následné statistické analýzy. (Nulová koncentrace řas v jedné ze dvou nebo tří nádob použitých k opakování může ukazovat na to, že nádoba nebyla správně naočkována nebo byla nesprávně vyčištěna.) Důvody k odmítnutí datového bodu jako odlehlé hodnoty musí být jasně uvedeny ve zkušebním protokolu. Přijatelnými důvody jsou pouze (vzácné) procesní chyby a nikoli jen malá preciznost. Statistické postupy pro rozpoznání odlehlé hodnoty mají u tohoto typu problému pouze omezené použití a nemohou nahradit odborné posouzení. Odlehlé hodnoty (takto označené) by nejlépe měly zůstat mezi datovými body zobrazenými v jakémkoliv následné grafickém či tabulárním zobrazení dat.

▼**M1**

2.2 PROMĚNNÉ ODEZVY

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené látky na růst řas. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

a) Průměrná specifická růstová rychlost: tato proměnná odezvy se vypočítává na základě logaritmického zvýšení biomasy během zkušebního období a vyjádří se na den.

b) Výtěžek: tato proměnná odezvy je biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa.

Při použití této metody v rámci práva EU by měl být výpočet výsledků založen na průměrné specifické růstové rychlosti, a to z níže uvedených důvodů. Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou všeobecně vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to díky matematické základně příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu řas v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontroly, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy „výtěžek“ jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. E_yC_x závisí na specifické růstové rychlosti druhů řas použitých v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých kmenů řas lišit. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy řas nebo dokonce různými kmeny. Přestože se z vědeckého hlediska dává přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti pro odhad toxicity, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současné právní požadavky v některých zemích.

2.2.1 **Průměrná růstová rychlost**

Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení biomasy z rovnice pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \ (\text{den}^{-1})$$

kde:

μ_{i-j}: je průměrná specifická růstová rychlost od doby *i* do doby *j*,

X_i: je biomasa v době *i*,

X_j: je biomasa v době *j*.

▼M1

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu vypočítejte střední hodnotu růstové rychlosti a odhady rozptylu.

Vypočítejte průměrnou specifickou růstovou rychlost po celou dobu trvání zkoušky (obvykle dny 0 až 3), přičemž namísto naměřené počáteční hodnoty použijte jako počáteční hodnotu spíše nominálně naočkovanou biomasu, protože se tímto způsobem obvykle dosáhne větší preciznosti. Jestliže zařízení použité pro měření biomasy umožňuje dostatečně precizní určení nízké biomasy inokula (např. průtokovým cytometrem), pak lze použít naměřenou počáteční koncentraci biomasy. Rovněž se vyhodnotí růstová rychlost po jednotlivých časových úsecích vypočtená jako specifické růstové rychlosti pro každý den v průběhu zkoušky (dny 0–1, 1–2 a 2–3) a prozkoumá se, zda-li růstová rychlost kontroly zůstává konstantní (viz kritéria validity, bod 1.7). Významně nižší specifická růstová rychlost v den jedna v porovnání s celkovou průměrnou specifickou růstovou rychlostí může poukazovat na fázi iniciace. Zatímco v kontrolních kulturách lze fázi iniciace minimalizovat a prakticky vyloučit správnou kultivací předkultury, fáze iniciace v exponovaných kulturách může být známkou obnovy po počátečním toxickém stresu nebo známkou snížené expozice vyvolané ztrátou zkoušené látky (včetně sorpce na biomasu řas) po počáteční expozici. Odpovídajícím způsobem lze vyhodnocovat růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené látky, které se vyskytly během expoziční doby. Významné rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek.

Vypočítejte procentuální inhibici růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky z rovnice:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

kde:

$\%I_r$: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

μ_C: střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti (μ) v kontrolní skupině,

μ_T: průměrná specifická růstová rychlost u opakování s exponovaným vzorkem.

Jestliže se k přípravě zkušebních roztoků používají rozpouštědla, pro výpočet procentuální inhibice by se měly namísto kontrol bez rozpouštědel používat kontroly s rozpouštědly.

2.2.2 **Výtěžek**

Výtěžek se vypočítá jako biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky. Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu výtěžku a odhady rozptylu. Procentuální inhibici výtěžku ($\%I_y$) lze vypočítat pro každé opakování s exponovanými vzorky následovně:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

kde:

$\% I_y$: procentuální inhibice výtěžku,

Y_C: střední hodnota výtěžku v kontrolní skupině,

Y_T: hodnota výtěžku u opakování s exponovaným vzorkem.

2.3 VYNÁŠENÍ KŘIVKY ZÁVISLOSTI KONCENTRACE-ODEZVA

Vyneste procentuální hodnotu inhibice proti logaritmu koncentrace zkušební látky a vynesené body pečlivě prozkoumejte, přičemž neberte v úvahu žádný takový datový bod, který byl v první fázi vyloučen jako odlehlá hodnota. Podle oka nebo pomocí počítačové interpolace veďte datovými body tenkou čáru, abyste získali první dojem o vztahu koncentrace a odezvy, poté přistupte k podrobnější metodě, nejlépe počítačové statistické metodě. V závislosti na zamýšleném použití dat, jakosti (preciznosti) a množství dat, jakož i na dostupnosti nástrojů pro analýzu dat může být rozhodnuto (a někdy je to dostatečně odůvodněno) o tom, že se analýza dat v tomto stadiu zastaví a klíčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/nebo EC_{20}) se jednoduše odečtou z křivky vytvořené podle oka (rovněž viz následující bod o stimulačních účincích). Platnými důvody pro nepoužití statistické metody mohou být:

— Údaje nejsou vhodné pro počítačové metody, které neposkytnou žádné spolehlivější výsledky než ty, které lze získat odborným posouzením – v takových situacích mohou dokonce některé počítačové programy selhat při získání spolehlivého řešení (iterace nemusí konvergovat atd.).

— Stimulační růstové odezvy nelze odpovídajícím způsobem zpracovat pomocí dostupných počítačových programů (viz níže).

2.4 STATISTICKÉ POSTUPY

Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (9), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (9). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s kvantálními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby mohly být použity s daty růstu či biomasy. Speciální postupy pro stanovení hodnoty EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (10, 11 a 12). Použití nelineární regresní analýzy je dále podrobně popsáno v dodatku 4.

▼M1

Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, použijte vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Jakost shodnosti dat odezvy s regresním modelem je zapotřebí vyhodnotit buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin. Pokud však je vynesení nelineární křivky obtížné či neúspěšné kvůli příliš velkému rozptylu dat, problém lze obejít provedením regrese na skupinových středních hodnotách, což je praktický způsob pro snížení vlivu podezřelých odlehlých hodnot. Použití této možnosti je zapotřebí zaznamenat ve zkušebním protokolu jako odchylku od normálního postupu v důsledku skutečnosti, že křivka, která vyhovuje jednotlivých opakováním, nevedla k uspokojivému výsledku.

Odhady EC_{50} a intervaly spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (13), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC a pro účinky zkoušené látky na růstovou rychlost je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (14, 15, 16, 17, 18). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (18). Mezi vhodné testy patří Levenův nebo Bartlettův test. Nesplnění předpokladu o homogenitě rozptylů lze někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylu extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako jsou testy sestupného trendu Jonckheere. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (12).

Vědecký rozvoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regrese. Vhodná hodnota pro x nebyla pro tuto zkoušku pomocí řas stanovena. Zdá se, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly ve zkušebním protokolu uvádět jak EC_{10}, tak EC_{20}.

2.5 STIMULACE RŮSTU

Při nízkých koncentracích bývá někdy pozorována stimulace růstu (negativní inhibice). To může být důsledkem buď hormese („toxická stimulace“), nebo přidání stimulujících růstových faktorů se zkušebním materiálem k minimálnímu použitému médiu. Nezapomeňte, že přidání anorganických živin by neměl mít žádný přímý účinek, protože zkušební médium by mělo po celou dobu zkoušky udržovat přebytek živin. Stimulaci nízkými dávkami lze ve výpočtech EC_{50} obvykle ignorovat, pokud není extrémní. Je-li však extrémní nebo má-li být vypočtena hodnota EC_x pro nízké x, může být zapotřebí speciálních postupů. K vymazání stimulačních odezev z analýzy dat by nemělo pokud možno dojít, a pokud dostupný software pro stanovení křivky nemůže drobnou stimulaci přijmout, lze použít lineární interpolaci s bootstrapem. Jestliže je stimulace extrémní, lze zvážit použití modelu předpokládajícího hormesi (19).

▼**M1**

2.6 NETOXICKÁ INHIBICE RŮSTU

Zkušební materiály absorbující světlo mohou způsobit snížení růstové rychlosti, protože stínění snižuje množství dostupného světla. Takové účinky fyzikální povahy je zapotřebí oddělit od toxických účinků, a to úpravou zkušebních podmínek, přičemž takové fyzikální účinky je zapotřebí uvádět ve zkušebním protokolu samostatně. Pokyny lze nalézt v literatuře (2 a 3).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti včetně meze rozpustnosti ve vodě,

— údaje o chemické identifikaci včetně čistoty.

Testovací druhy:

— kmen, dodavatel nebo zdroj a použité podmínky kultivace.

Zkušební podmínky:

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— popis plánu zkoušky: zkušební nádoby, objemy kultur, hustota biomasy na počátky zkoušky,

— složení média,

— zkušební koncentrace a opakování (například počet opakování, počet zkušebních koncentrací a použitá geometrická progrese),

— popis přípravy zkušebních roztoků včetně použití rozpouštědel atd.,

— kultivační zařízení,

— intenzita a kvalita světla (zdroj, homogenita),

— teplota,

— zkušební koncentrace: nominální zkušební koncentrace a jakékoliv výsledky analýz pro stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách. Ve zkušebním protokolu je třeba uvést výtěžnost metody a mez kvantifikace ve zkušební matrici,

— všechny odchylky od této zkušební metody,

— metoda pro stanovení biomasy a důkaz o korelaci mezi naměřeným parametrem a suchou hmotností.

Výsledky:

— hodnoty pH na počátku a konci zkoušky u všech expozic,

— biomasa pro každou baňku v každém měřicím bodě a metoda pro měření biomasy,

▼**M1**

— růstové křivky (vynášení biomasy vůči času),

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačním koeficientem pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a účinku,

— odhady toxicity pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,

— jakékoliv jiné pozorované účinky, např. morfologické změny řas,

— diskuse výsledků včetně jakéhokoli vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

4. **LITERATURA**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

(2) ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Jakost vod – Odběr vzorků – Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků. ISO 5667–16.

(5) ISO 1993: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. ISO 8692.

(6) Mayer, P., Cuhel, R., Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.

(7) Slovacey, R.E., Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), 919–925

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem*. 22, 2073–2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713–718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157–167.

(11) Bruce, R.D., Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem*. 11:1485–1494.

(12) OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096–1121.

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510–531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼M1

Dodatek 1

Kmeny, u nichž byla prokázána vhodnost pro zkoušku

Zelené řasy

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve známá jako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (dříve známá jako *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Rozsivky

— *Navicula pelliculosa,* UTEX 664

Sinice

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Zdroje kmenů

Doporučené kmeny jsou k dispozici v jednodruhových kulturách z následujících sbírek (v abecedním pořadí):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110–2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NĚMECKO

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M1

Vzhled a charakteristiky doporučených druhů

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Vzhled	zakřivené, zkroucené jednotlivé buňky	oválné, většinou jednotlivé buňky	tyčinky	řetězce oválných buněk	tyčinky
Velikost (d × š) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Buněčný objem (μm^3/buňka)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Hmotnost buněčné sušiny (mg/buňka)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Růstová rychlost (3) (den^{-1})	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Měřeno elektronickým počítačem částic.
(2) Vypočítáno z velikosti.
(3) Nejčastěji pozorovaná růstová rychlost v médiu OECD při světelné intenzitě přibližně 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a teplotě 21 °C.

Specifická doporučení ohledně kultivace doporučených zkušebních druhů a nakládání s nimi

Pseudokirchneriella subcapitata a Desmodesmus subspicatus

Tyto zelené řasy se všeobecně snadno udržují v různých kultivačních médiích. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur. Buňky jsou normálně samostatné a měření hustoty buněk lze snadno provádět pomocí elektronického počítače částic nebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pro uchovávání zásobní kultury lze použít různá růstová média. Zvláště důležité je zabránit tomu, aby vsázková kultura překročila při obnově fázi logaritmického růstu; zpětné získání je v tomto bodě obtížné.

Anabaena flos-aquae vytváří shluky vnořených řetězců buněk. Velikost těchto shluků se může měnit s kultivačními podmínkami. Může vzniknout potřeba tyto shluky rozrušit, pokud se ke stanovení biomasy použije počítání pod mikroskopem nebo elektronický počítač částic.

Pro snížení variability počtu mohou být v dílčích vzorcích použity k rozrušení řetězců ultrazvukové vibrace. Delší ultrazvukové vibrace, než jsou nutné k rozrušení řetězců do kratších délek, mohou buňky zničit. Intenzita ultrazvukových vibrací a doba trvání musí být shodné pro každou expozici.

Spočítejte na hemocytometru dostatek políček (nejméně 400 buněk), což pomůže variabilitu kompenzovat. Tím se zlepší spolehlivost mikroskopického stanovení hustoty.

Pro stanovení celkového buněčného objemu sinic rodu *Anabaena* po rozrušení buněčných řetězců opatrnými ultrazvukovými vibracemi lze použít elektronický počítač částic. Ultrazvuková energie se musí nastavit tak, aby se zabránilo narušení buněk.

Aby se zajistilo dobré promíchání a homogenita suspense řas použitých k naočkování zkušebních nádob, použijte vířivou míchačku nebo podobnou odpovídající metodu.

▼**M1**

Zkušební nádoby je nutno umístit na stůl orbitální nebo reciproké třepačky při přibližně 150 otáčkách za minutu. Případně lze použít občasné promíchávání ke snížení sklonu sinic rodu *Anabaena* vytvářet shluky. Jestliže ke shlukování dojde, musí se postupovat pečlivě k získání reprezentativních vzorků pro měření biomasy. Pro rozrušení shluků sinic před odběrem vzorků může být nezbytné intenzivní promíchávání.

Synechococcus leopoliensis

Pro uchovávání zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur.

Synechococcus leopoliensis vyrůstají jako jednotlivé buňky tyčinkového tvaru. Buňky jsou velmi malé, což ztěžuje použití počítání pod mikroskopem pro měření biomasy. Užitečné jsou elektronické počítače částic vybavené pro počítání částic až do velikosti přibližně 1 μm. Rovněž jsou využitelná fluorometrická měření *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Pro uchovávání zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur. Je nutné mít na paměti, že v médiu se vyžaduje přítomnost křemičitanu.

Navicula pelliculosa může za určitých růstových podmínek vytvářet shluky. Buňky mají někdy sklon se shlukovat v povrchovém filmu kvůli produkci lipidů. Za těchto okolností se musí přijmout zvláštní opatření, když se odebírají dílčí vzorky pro stanovení biomasy s cílem získat reprezentativní vzorky. Může být nutné intenzivní protřepávání, např. použití vířivé míchačky.

▼M1

Dodatek 2

Růstová média

Lze použít jedno ze dvou následujících růstových médií:

Médium OECD: původní médium podle Pokynu OECD pro zkoušení 201, rovněž podle normy ISO 8692.

Médium US. EPA AAP, rovněž podle ASTM.

Při přípravě těchto médií je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

Složení média AAP (US. EPA) a média podle Pokynu OECD pro zkoušení 201

Složka	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Molární poměr EDTA k železu mírně překračuje jednu. Tím se zabrání srážení železa a současně se minimalizuje chelatace iontů těžkých kovů.

Při zkoušce s rozsivkou *Navicula pelliculosa* musí být obě média doplněna $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ pro dosažení koncentrace 1,4 mg Si/l.

pH média se získá při rovnováze mezi uhličitanovým systémem média a parciálním tlakem CO_2 v atmosférickém vzduchu. Přibližný vztah mezi pH při 25 °C a molární koncentrací hydrogenuhličitanu je:

$$pH_{rovan} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼**M1**

S 15 mg/l $NaHCO_3$ je pH_{rovn} = 7,5 (médium US. EPA) a s 50 mg/l $NaHCO_3$ je pH_{rovn} = 8,1 (médium OECD).

Prvkové složení zkušebních médií

Prvek	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Příprava média OECD

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku
Zásobní roztok č. 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok č. 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok č. 3: stopové prvky	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok 4: hydrogenuhličitan	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Vysterilizujte zásobní roztoky membránovou filtrací (střední průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 minut). Roztoky skladujte v temnu při 4 °C.

Zásobní roztoky 2 a 4 neošetřujte v autoklávu, ale sterilizujte je membránovou filtrací.

▼M1

Připravte růstové médium přidáním odpovídajícího objemu zásobních roztoků 1 až 4 do vody:

Do 500 ml sterilizované vody přidejte:

— 10 ml zásobního roztoku 1,

— 1 ml zásobního roztoku 2,

— 1 ml zásobního roztoku 3,

— 1 ml zásobního roztoku 4.

Doplňte do 1 000 ml sterilizovanou vodou.

Nechte stát dostatečně dlouhou dobu na to, aby se vytvořila rovnováha média s atmosférickým CO_2, v případě potřeby pomocí probublávání sterilním filtrovaným vzduchem po několik hodin.

Příprava média AAP

A1.1 Přidejte 1 ml každého zásobního roztoku v A1.2.1–A1.2.7 do přibližně 900 ml deionizované nebo destilované vody a poté nařeďte do 1 l.

A1.2 Zásobní roztoky makroživin se připravují rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody. Činidla A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 a A1.2.4 lze spojit do jednoho zásobního roztoku:

A1.2.1 $NaNO_3$—12,750 g.

A1.2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$—6,082 g.

A1.2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$—2,205 g.

A1.2.4 Zásobní roztok mikroživin – (viz A1.3).

A1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—7,350 g.

A1.2.6 K_2HPO_4—0,522 g.

A1.2.7 $NaHCO_3$—7,500 g.

A1.2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – viz poznámka A1.1.

Poznámka A1.1 – Používejte pouze pro testovací druhy rozsivek. Může být přidán přímo (202,4 mg) nebo prostřednictvím zásobního roztoku, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 20 mg/l Si v médiu.

A1.3 Zásobní roztok mikroživin se připravuje rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody:

A1.3.1 H_3BO_3—92,760 mg.

A1.3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$—207,690 mg.

A1.3.3 $ZnCl_2$—1,635 mg.

A1.3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$—79,880 mg.

A1.3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$—0,714 mg.

A1.3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$—3,630 mg.

A1.3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$—0,006 mg.

A1.3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$—150,000 mg.

[dinatrium-ethylendiamintetraacetát dihydrát].

▼**M1**

A1.3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$—0,005 mg, viz poznámka A1.2.

Poznámka A1.2 – Používejte pouze v médiu pro zásobní kultury druhů rozsivek.

A1.4 Upravte pH na 7,5 ± 0,1 přidáním 0,1 *N* nebo 1,0 *N* NaOH nebo HCl.

A1.5 Odfiltrujte média do sterilní nádoby prostřednictvím 0,22μm membránového filtru, pokud se má používat počítač částic, nebo 0,45μm filtru, pokud se počítač částic používat nemá.

A1.6 Médium skladujte až do použití v temnu při teplotě přibližně 4 °C.

▼M1

Dodatek 3

Příklad postupu kultivace řas

Obecné poznámky

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity.

Musí být použity vhodné metody k tomu, aby bylo zajištěno, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi. Vhodné mohou být axenické kultury, avšak musí se vytvořit a používat jednodruhové kultury.

Všechny operace se musí provádět za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami.

Zařízení a materiály

Viz zkušební metoda: Přístroje a pomůcky.

Postupy při získávání kultur řas

Příprava živných roztoků (média):

Všechny soli živin média se připravují jako koncentrované zásobní roztoky a skladují se v temnu a chladu. Tyto roztoky jsou sterilizovány filtrací nebo autoklávem.

Médium se připraví přidáním správného množství zásobního roztoku do sterilní destilované vody, přičemž se dbá na to, aby nedošlo k žádné infekci. K získání pevného média se přidává 0,8 procent agaru.

Kmenová kultura:

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se pravidelně přenášejí do čerstvého média, kde slouží jako výchozí zkušební materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, vyočkovávají se na šikmý agar. Poté se nejméně jednou za dva měsíce přenášejí do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmeyerových baňkách obsahujících vhodné médium (objem přibližně 100 ml). Jsou-li řasy kultivovány při teplotě 20 °C a stálém osvětlení, musí se přenášet každý týden.

Při přeočkování se přenese sterilní pipetou do baňky s čerstvým médiem takové množství „staré“ kultury, aby byla počáteční koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace kultury staré.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout hustotu, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. K tomu musí dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura:

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas potřebných pro naočkování zkušebních kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po inkubační lhůtě o délce 2 až 4 dní. Obsahují-li kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

▼M1

Dodatek 4

Datová analýza pomocí nelineární regrese

Obecné poznámky

Odezva ve zkoušce růstu řas a jiných zkouškách mikrobiálního růstu – růstu biomasy je svojí povahou spojitá nebo metrická proměnná – procesní rychlost, jestliže se používá růstové rychlosti, a její integrál během doby, pokud se zvolí biomasa. Obě jsou popsány příslušnou střední odezvou neexponovaných kontrol použitých k opakování, jež ukazují maximální odezvu při daných podmínkách – přičemž světlo a teplota jsou primární určující faktory ve zkoušce růstu řas. Systém je distribuovaný nebo homogenní a na biomasu lze pohlížet jako na kontinuum při zanedbání jednotlivých buněk. Distribuce rozptylu typu odezvy pro takový systém závisí výlučně na experimentálních faktorech (obvykle popsaných lognormálními nebo normálními distribucemi chyb). To je v kontrastu k typickým odezvám biologických zkoušek s kvantálními daty, u nichž se často předpokládá, že tolerance (obvykle binominálně distribuovaná) jednotlivých organismů je dominantní složkou rozptylu. Zde jsou kontrolní odezvy nula nebo základní úroveň.

V nekomplikované situaci normalizovaná nebo relativní odezva, *r*, monotónně klesá z 1 (nulová inhibice) na 0 (stoprocentní inhibice). Je třeba mít na paměti, že všechny odezvy mají přidruženou chybu a že očividně negativní inhibice lze vypočítat pouze jako výsledek náhodné chyby.

Regresní analýza

Modely

Cílem regresní analýzy je kvantitativně popsat křivku závislosti koncentrace a odezvy ve formě matematické regresní funkce $Y = f(C)$ nebo častěji $F(Z)$, kde $Z = \log C$. Použití inverzní funkce $C = f^{-1}(Y)$ dovoluje vypočítat hodnoty EC_x včetně EC_{50}, EC_{10} a EC_{20} a jejich 95 % intervaly spolehlivosti. Prokázalo se, že vztah koncentrace a odezvy získané ve zkouškách inhibice růstu řas úspěšně popisuje několik jednoduchých matematických funkcí. Funkce například obsahují logistickou rovnici, nesymetrickou Weibullovu rovnici a lognormální distribuční funkci, které jsou všechny esovitými křivkami asymptoticky se blížícími jedné pro $C \rightarrow 0$ a nule pro $C \rightarrow$ nekonečno.

Použití modelů spojité prahové funkce (např. Kooijmanův model „pro inhibici populačního růstu“, Kooijman *et al*. 1996) byl nedávno navržen jako alternativa k modelům asymptotickým. Tento model nepředpokládá žádné účinky při koncentracích pod určitým prahem, EC0+, který se odhaduje extrapolací vztahu koncentrace a odezvy pro protnutí osy koncentrace pomocí jednoduché spojité funkce, která není v počátečním bodě diferencovatelná.

Je třeba mít na paměti, že analýza může být prostou minimalizací reziduálních součtů čtverců (za předpokladu konstantního rozptylu) nebo vážených čtverců, pokud se kompenzuje heterogenita rozptylu.

▼**M1**

Postup

Postup lze nastínit následovně: zvolte příslušnou funkční rovnici, Y = f (C), a uzpůsobte ji podle údajů pomocí nelineární regrese. Je lepší použít měření z každé jednotlivé baňky než střední hodnoty opakování, aby se z dat získalo co nejvíce informací. Jestliže je rozptyl vysoký, praktická zkušenost naopak naznačuje, že střední hodnoty opakování mohou poskytovat spolehlivější matematický odhad, méně ovlivněný náhodnými chybami v datech, než tomu je u každého zachovaného jednotlivého datového bodu.

Vyneste vytvořenou křivku a naměřená data a prozkoumejte, zda-li byla křivka vynesena správně. Analýza reziduálních hodnot může být pro tento účel mimořádně užitečným nástrojem. Jestliže zvolený funkční vztah pro vyjádření odezvy koncentrace nepopisuje celou křivku nebo její některou zásadně důležitou část, například odezvu při propadu nízkých koncentrací, zvolte jinou variantu vložení křivky – např. nesymetrickou křivku, jako je Weibullova funkce, namísto křivky symetrické. Negativní inhibice mohou být problém například u lognormální distribuční funkce, která podobně vyžaduje alternativní regresní funkci. Takovým negativním hodnotám se nedoporučuje přiřazovat nulu nebo malou kladnou hodnotu, protože se tím deformuje distribuce chyb. Může být vhodné nasadit na části křivky samostatnou křivku, například v části s nízkou inhibicí pro odhad hodnot $EC_{\text{nízké x}}$. Vypočítejte ze vsazené rovnice („inverzním odhadem“ $C = f^{-1}(Y)$) odhady charakteristického bodu EC_x a uveďte minimálně EC_{50} a jeden nebo dva odhady $EC_{\text{nízké x}}$. Zkušenost z praktického zkoušení ukázala, že preciznost zkoušky růstu řas obyčejně umožňuje přiměřeně přesný odhad na úrovni 10 % inhibice, jsou-li datové body dostačující – pokud se nevyskytne stimulace při nízkých koncentracích jakožto zkreslující faktor. Preciznost odhadu EC_{20} je často značně lepší než přesnost odhadu EC_{10}, protože EC_{20} je obvykle umístěna na přibližně lineární části centrální křivky odezvy koncentrace. Někdy lze EC_{10} interpretovat jen obtížně kvůli růstové stimulaci. Proto zatímco je EC_{10} normálně zjistitelná s dostatečnou přesností, rovněž se vždy doporučuje uvádět EC_{20}.

Váhové faktory

Experimentální rozptyl není obecně konstantní a typicky zahrnuje proporcionální složku, proto je výhodné běžně provádět váženou regresi. Váhové faktory pro takovou analýzu se obvykle považují za nepřímo úměrné k rozptylu:

$$w_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Mnoho regresních programů má možnost vážené regresní analýzy s váhovými faktory uvedenými v tabulce. Váhové faktory by se měly pohodlně normalizovat vynásobením $n/\sum w_i$ (n je počet datových bodů) tak, aby se jejich součet rovnal jedné.

Normalizace odezev

Normalizování střední kontrolní odezvou způsobuje určité principiální problémy a vede ke vzniku poněkud komplikované struktury rozptylů. Dělením odezev střední kontrolní odezvou pro získání procentuální hodnoty inhibice se zavádí dodatečná chyba způsobená chybou kontrolní střední hodnoty. Není-li tato chyba zanedbatelně malá, musí se opravit váhové faktory v regresi a intervaly spolehlivosti na kovarianci s kontrolou (17). Je nutné mít na paměti, že je důležitá vysoká preciznost u odhadované střední kontrolní odezvy pro minimalizaci celkového rozptylu u relativní odezvy. Tento rozptyl je následující:

▼M1

(*i* v dolním indexu znamená úroveň koncentrace *i* a 0 v dolním indexu odkazuje na kontroly)

$$Y_i = \text{relativní odezva} = r_i/r_0 = 1 - I = \text{f}\ (C_i)$$

s rozptylem:

$$\text{Var}\ (Y_i) = \text{Var}\ (r_i/r_0)\ \delta\ (\delta Y_i\ /\ \delta\ r_i)^2 \cdot\ \text{Var}(r_i) + (\delta\ Y_i/\ \delta\ r_0)^2 \cdot \text{Var}\ (r_0)$$

a jelikož

$$(\delta\ Y_i/\ \delta\ r_i) = 1/r_0 \text{ a } (\delta\ Y_i\ /\ \delta\ r_0) = r_i/r_0^2$$

s normálně distribuovanými daty a opakováními m_i a m_0:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

se pak celkový rozptyl relativní odezvy Y_i vypočítá:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

Chyba kontrolní střední hodnoty je nepřímo úměrná druhé odmocnině počtu zprůměrovaných kontrolních opakování, přičemž někdy je odůvodněné zanést historická data, čímž se chyba značně sníží. Alternativním postupem je data nenormalizovat a nevynášet absolutní odezvy včetně dat kontrolní odezvy, nýbrž zavést hodnoty kontrolní odezvy jakožto dodatečný parametr, který bude upraven lineární regresí. Zatímco obvyklá regresní rovnice je dvouparametrická, tato metoda vyžaduje vnesení 3 parametrů, a proto potřebuje více datových bodů než nelineární regrese prováděná s daty, která jsou normalizována pomocí předem stanovené kontrolní odezvy.

Inverzní intervaly spolehlivosti

Výpočet nelineárních regresních intervalů spolehlivosti inverzním odhadem je poněkud složité a není to dostupná standardní možnost v běžných balících statistických počítačových programů. Přibližné intervaly spolehlivosti lze získat pomocí standardních programů nelineární regrese s opakovanou parametrizací (Bruce a Versteeg, 1992), což zahrnuje přepisování matematické rovnice za použití požadovaných odhadů bodů, např. EC_{10} a EC_{50} jakožto parametrů, které se mají odhadnout. Nechť je funkce I = f (α, β, koncentrace); definiční vztahy f (α, β, EC_{10}) = 0,1 a f (α, β, EC_{50}) = 0,5 se použijí k nahrazení f (α, β, koncentrace) ekvivalentní funkcí g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrace).

Přímější výpočet (Andersen *et al*., 1998) se provádí zachováním původní rovnice a použitím Taylorova rozšíření okolo středních hodnot r_i a r_0.

V poslední době se staly oblíbenými metody „bootstrap“. Takové metody používají naměřených údajů a častého opětovného odběru vzorků určovaného generátorem náhodných čísel pro odhad empirické distribuce rozptylů.

Literatura

Kooijman, S.A.L.M., Hanstveit, A.O., Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Bruce, R.D.; Versteeg, D.J.(1992): A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Env. Toxicol. Chem*.11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

▼B

C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

ČÁST I. OBECNÉ ÚVAHY

I.1. ÚVOD

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

a) zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4-A);

b) modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4-B);

c) zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO_2) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4-C);

d) zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4-D);

e) zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4-E);

f) zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu – Japonsko) (metoda C.4-F).

Obecné a společné úvahy pro všech šest zkoušek jsou uvedeny v části I metody. Specifické body jednotlivých metod jsou uvedeny v částech II až VII. Dodatky obsahují definice, vzorce a návody.

Mezilaboratorní srovnávací test OECD provedený v roce 1988 ukázal, že metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru látky, která má být zkoušena, se však může dávat přednost určité metodě.

I.2. VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, tenzi par a o adsorpčních vlastnostech chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO_2, DOC, TOC, CHSK (viz dodatky 1 a 2) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkoušené chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je alespoň 100 mg/l, lze zkoušet všemi metodami za předpokladu, že netěkají a neadsorbují se. Pro látky špatně rozpustné ve vodě, které těkají nebo se adsorbují, jsou vhodné metody uvedené v tabulce 1. Způsob, jakým je třeba zacházet s látkami špatně rozpustnými ve vodě a s látkami těkavými, je popsán v dodatku 3. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud je ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro zohlednění případné fyzikální ztráty.

▼B

Tabulka 1

Použitelnost zkušebních metod

Zkouška	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		špatně rozpustné	těkavé	adsorbující se
na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
modif. zkouška OECD – na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
na uvolňování CO_2	respirometrie: uvolňování CO_2	+	-	+
manometrická respirometrie	manometrická respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+
zkouška v uzavřených lahvičkách	respirometrie: rozpuštěný kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+

Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud jsou výsledky nízké nebo marginální, se vyžadují informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušeného materiálu.

Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro bakterie (dodatek 4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

I.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Pro ověření postupu se souběžně se zkouškou a ve vlastní baňce zkoušejí referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě předestilovaný), natriumacetát, natriumbenzoát. Všechny tyto referenční chemické látky se za podmínek v uvedených metodách rozkládají, i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Byl podán návrh hledat referenční chemickou látku, která by byla snadno rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Navržen byl kaliumhydrogenftalát. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Roztok nebo suspense zkoušené látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkoušené látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

▼B

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO_2 nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplňkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziproduktu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tři po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

I.5. KRITÉRIA JAKOSTI

I.5.1. **Reprodukovatelnost**

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.

Je obecně známo, že čím vyšší je koncentrace mikroorganismů přidaných na počátku do zkušebního média, tím menší jsou rozdíly mezi vícenásobnými měřeními. Okružní testy rovněž ukázaly, že mezi výsledky získanými různými laboratořemi mohou být velké rozdíly, avšak u snadno biologicky rozložitelných sloučenin se obvykle dosahuje dobré shody.

I.5.2. **Platnost zkoušky**

Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkoušené chemické látky v oblasti plató křivky menší než 20 % a dosáhl-li stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje. Vzhledem k náročnosti metod neznamenají nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkoušená látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkoušenou látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35 % rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25 % rozkladu (stanoveného podle TSK nebo TCO_2), lze zkoušené chemické látky považovat za inhibující (viz také dodatek 4). Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkoušené chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg pevných látek v litru.

I.6. OBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVA

Obecné podmínky pro zkoušky jsou shrnuty v tabulce 2. Přístroje a další experimentální podmínky specifické pro jednotlivé metody jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.

▼B

Tabulka 2

Zkušební podmínky

Zkouška	Zkouška na úbytek DOC	Zkouška na uvolňování CO_2	Manometrická respirometrie	Modif. screeningová zkouška OECD	Zkouška v uzavřených lahvičkách	Zkouška MITI (I)
Koncentrace zkoušené látky					2–10	100
mg/l			100			
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg TSK/l			50–100		5–10	
Koncentrace inokula (buňky/1, přibližně)	≤ 30 mg/l SL nebo ≤ 100 ml odpadní vody/l (10^7–10^8)			0,5 ml sekundární odpadní vody/l (10^5)	≤ 5 ml odpadní vody/l (10^4–10^6)	30 mg/l SL (10^7–10^8)
Koncentrace prvků v minerálním médiu (v mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					nejlépe 7,0
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = rozpuštěný organický uhlík, TSK = teoretická spotřeba kyslíku, SL = suspendované látky

I.6.1. **Ředicí voda**

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda neobsahující inhibující koncentrace toxických látek (např. ionty Cu^{2+}). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku vneseného zkoušeným materiálem. Vysoká čistota vody pro zkoušky je nezbytná proto, aby se nevyskytovaly vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminace může pocházet z vlastních přítomných nečistot, z materiálu měniče iontů, z rozkladných látek z bakterií a řas. Pro každou sérii měření se použije pouze jedna šarže vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených lahvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

▼B

I.6.2. **Zásobní roztoky minerálních složek**

Pro přípravu zkušebních roztoků se připraví zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zřeďovacích faktorech) pro metodu s úbytkem DOC, modifikovanou screeningovou metodu OECD, metodu s uvolňováním CO_2, pro manometrickou respirometrii a pro metodu s uzavřenými lahvičkami.

Zřeďovací faktory a specifická příprava minerálního media pro zkoušku MITI jsou uvedeny v oddílech pro jednotlivé zkoušky.

Zásobní roztoky:

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

a) Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

Chlorid amonný, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4.

b) Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$ 27,50 g

nebo chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

c) Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4 . 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

d) Chlorid železitý hexahydrát, $FeC1_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

Poznámka: Aby nebylo nutné připravovat tento roztok bezprostředně před použitím, přidá se jedna kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr.

I.6.3. **Zásobní roztoky chemických látek**

Pokud je rozpustnost vyšší než 1 g/l, rozpustí se například 1–10 g (podle potřeby) zkoušené nebo referenční látky v deionizované vodě a doplní se na 1 litr. Jinak se zásobní roztoky připravují v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud jde o postup s méně rozpustnými chemickými látkami, viz dodatek 3; ve zkoušce MITI (metoda C.4-F) se nepoužívají ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

▼B

I.6.4. **Inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi. Používá-li se aktivovaný kal ve zkoušce na úbytek DOC, na uvolňování CO_2 a ve zkoušce manometrickou respirometrií, měl by být odebrán z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované screeningové zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je potřebné zředěnější inokulum bez vloček kalu a nejvhodnějším zdrojem je voda z druhého stupně čistírny domovních odpadních vod nebo z laboratorní jednotky. Pro zkoušku MITI se inokulum získává ze směsi zdrojů a je popsáno v oddílu věnovaném této zkoušce.

I.6.4.1. *Inokulum z aktivovaných kalů*

Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Podle potřeby se filtrací přes jemné síto odstraní hrubé částice a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Jinou možností je usazení nebo odstředění (např. 10 minut při 1 100 g) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se odstraní. Kal se promyje minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných pevných látek na litr a až do použití se provzdušňuje.

Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, voda nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných pevných látek.

Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 minuty zpracovává v mechanickém mísiči při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá 30 minut, popřípadě déle, usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml/l minerálního média.

I.6.4.2. *Jiné zdroje inokula*

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se 1 hodinu usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a dekantovaná kapalina nebo filtrát se až do použití udržuje v aerobních podmínkách. Na litr média lze použít až 100 ml tohoto typu inokula.

▼B

Dalším zdrojem inokula je povrchová voda. V tomto případě se odebere vzorek vhodné povrchové vody, např. říční nebo jezerní vody, a uchovává se až do použití v aerobních podmínkách. V případě potřeby se inokulum zkoncentruje filtrací nebo odstředěním.

I.6.5. **Předběžná úprava inokulí**

Inokula je možné předběžně upravit pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkušenou látku. Předběžná úprava spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5–7 dnů při zkušební teplotě. Předběžná úprava někdy zlepší přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předúprava inokula pro zkoušku MITI se nepovažuje za nutnou.

I.6.6. **Abiotické kontroly**

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkoušené látky stanovením úbytku DOC, příjmu kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého ve sterilních kontrolách bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací přes membránu (0,2–0,45 μm) nebo přidáním vhodné toxické látky v odpovídající koncentraci. Používá-li se membránová filtrace, odebírají se vzorky asepticky, aby byla zachována sterilita. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkoušené látky, měly by zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotickou kontrolu, která je inokulována a intoxikována.

I.6.7. **Počet nasazených baněk**

Počet nasazených baněk v typické zkoušce je uveden v oddílech věnovaných jednotlivým zkouškám.

Mohou být použity tyto baňky:

— zkušební suspense: obsahující zkoušenou látku a inokulum,

— slepá zkouška s inokulem: obsahující pouze inokulum,

— kontrolní zkouška postupu: obsahující referenční látku a inokulum,

— abiotická sterilní kontrola: sterilní, obsahující zkoušenou látku (viz I.6.6),

— kontrola adsorpce: obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo,

— kontrola toxicity: obsahující zkoušenou látku, referenční látku a inokulum.

Stanovení ve zkušební suspensi a slepý pokus s inokulem musí být prováděny souběžně. Doporučuje se, aby stanovení v ostatních baňkách bylo prováděno rovněž souběžně.

To však nemusí být vždy možné. Je třeba zajistit, aby se odebíral dostatečný počet vzorků nebo aby se prováděl dostatečný počet odečtů pro vyhodnocení procenta úbytku v 10denním období rozkladu.

▼B

I.7. DATA A HODNOCENÍ

Při výpočtu rozkladu v procentech D_t se použijí střední hodnoty z měření parametru provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem.Vzorce jsou uvedeny dále v oddílech pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uvede úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.7.1. **Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC**

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz I.5.2) by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkoušenou látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně. Vypočte se podle této rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t,

C_o = střední počáteční koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku (v mg DOC na litr),

C_t = střední koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku v čase t (v mg DOC na litr),

C_{bo} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu (v mg DOC na litr),

C_{bt} = střední koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu v čase t (v mg DOC na litr).

Všechny koncentrace se stanoví experimentálně.

I.7.2. **Rozklad měřený specifickou analýzou**

Je-li možné získat specifické analytické údaje, vypočte se primární biologický rozklad z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t, obvykle po 28 dnech,

S_a = zbylé množství zkoušené látky v médiu s inokulem na konci zkoušky (mg),

S_b = zbylé množství zkoušené látky ve slepém pokusu s vodou/médiem, do kterých byla přidána pouze zkoušená látka (mg).

▼B

1.7.3. **Abiotický rozklad**

Použije-li se abiotická sterilní kontrola, vypočte se abiotický rozklad v procentech podle rovnice:

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(o)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den 0,

$C_{s(t)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den t.

I.8. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— zkoušené a referenční chemické látky a jejich čistota,

— zkušební podmínky,

— inokulum: charakter a místo/místa odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,

— podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,

— délka zkoušky a teplota,

— v případě špatně rozpustných zkoušených látek použitý způsob zpracování,

— použitá zkušební metoda; měly by být uvedeny vědecké důvody a vysvětlení pro veškeré změny postupu,

— přehled dat,

— veškeré pozorované projevy inhibice,

— jakýkoli pozorovaný abiotický rozklad,

— specifická analytická data o chemické látce, pokud existují,

— analytická data o meziproduktech, pokud existují,

— graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkoušenou a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici (dodatek 1). Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkoušenou látku,

— rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti plató a na konci zkoušky.

ČÁST II. **ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC** (metoda C.4-A)

II.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako nominální jediný zdroj organického uhlíku se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

▼B

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace.

II.2. POPIS METODY

II.2.1. **Aparatura**

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

II.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

II.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I.6.4.), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30 mg suspendovaných látek na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

▼B

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

II.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

II.2.6. **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

II.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

II.3.1. **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

▼B

II.3.2. **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

II.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

II.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0: mg/l

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg/l

5. **STANOVENÍ UHLÍKU**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					

▼B

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepá zkouška s inokulem bez zkoušené látky	3	c_1					
		c_2					
		c, střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Baňka č.		Rozklad v % po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Střední hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	

▼B

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST III. **MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD** (metoda C.4-B)

III.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako jediný zdroj organického uhlíku se inokuluje 0,5 ml odpadní vody na litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace.

III.2. POPIS METODY

III.2.1 Aparatura

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

III.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 80 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V této metodě se používá jako inokulum pouze 0,5 ml odpadní vody na litr, a proto je nutné do média dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na jeden litr výsledného média:

▼B

Roztok stopových prvků:

Síran manganatý tetrahydrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinečnatý heptahydrát, $ZnSO_4 . 7 H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamonný, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe ($FeCl_3$ s kyselinou ethylendiamintetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustí se v ředicí vodě a doplní se touto vodou na 1 000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg

Kvasničný extrakt se rozpustí ve 100 ml vody. Sterilizuje se průchodem membránou 0,2 μm, nebo se připraví čerstvě.

III.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Viz I.6.4.2 a I.6.5.

Použije se 0,5 ml na litr minerálního média.

III.2.4. **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují odpadní vodou z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I.6.4.2) v objemu 0,5 ml na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

▼B

III.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

III.2.6. **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

III.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

III.3.1. **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

III.3.2 Platnost výsledků

Viz bod I.5.2.

III.3.3 Zprávy

Viz bod I.8.

III.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

▼B

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0: … mg/l

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: … mg/l

5. STANOVENÍ UHLÍKU

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulutn	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					
Slepá zkouška s inokuletn bez zkoušené látky	3	c_1					
		C_2					
		c, střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT**

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Střední hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Cas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST IV. ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO_2 (metoda C.4-C)

IV.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené látky (10–20 mg DOC nebo TOC na litr), která je jediným zdrojem uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle regulovaným proudem vzduchu bez CO_2. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím vznikajícího CO_2 jímaného v roztoku hydroxidu barnatého nebo sodného, kde se stanoví titrací zbytkového hydroxidu nebo jako anorganický uhlík. Množství CO_2 vzniklého ze zkoušené látky (po korekci na CO_2 pocházející z čistého inokula) se vyjádří v procentech TCO_2. Stupeň biologického rozkladu může být také vypočten z doplňkového stanovení DOC na začátku a na konci inkubace.

▼B

IV.2. POPIS METODY

IV.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) baňky na 2–5 l vybavené provzdušňovací trubicí dosahující až ke dnu nádoby a výstupním otvorem;

b) magnetické míchačky pro zkoušení špatně rozpustných látek;

c) absorpční lahev;

d) zařízení pro regulaci a měření průtoku vzduchu;

e) zařízení pro odstraňování CO_2 při přípravě vzduchu bez CO_2, popřípadě může být použita směs kyslíku bez CO_2 a dusíku bez CO_2 ve správném poměru (20 % O_2 a 80 % N_2) z lahví se stlačenými plyny;

f) zařízení na stanovení CO_2 buď titračně nebo pomocí analyzátoru anorganického uhlíku;

g) zařízení pro membránovou filtraci (podle volby);

h) analyzátor DOC (podle volby).

IV.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

IV.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. **Příprava baněk**

Jako příklad jsou uvedeny hodnoty pro baňky na 5 litrů obsahující 3 litry suspense. V případě použití menších objemů se hodnoty úměrně upraví, musí být ovšem zajištěno, aby bylo možné přesně měřit vznikající CO_2.

Do každé baňky na 5 litrů se přenese 2 400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I.6.4.1 a I.6.5), aby koncentrace suspendovaných látek v konečném objemu 3 litry inokulované směsi byla 30 mg/l. Eventuálně lze nejdříve zředit připravený kal v minerálním médiu na suspensi o koncentraci 500–1 000 mg/l a poté přidat alikvotní části do baňky na 5 litrů, aby byla dosažena koncentrace 30 mg/l; zajistí se tím větší přesnost. Mohou být použity i jiné zdroje inokula (viz I.6.4.2).

Inokulovaná směs se přes noc provzdušňuje vzduchem bez CO_2, aby se ze systému odstranil oxid uhličitý.

▼B

Odděleně do dvojic baněk se ze zásobních roztoků přidá zkoušená látka a referenční látka tak, aby koncentrace pocházející z chemických látek byla v rozmezí 10 až 20 mg DOC nebo TOC na litr; některé lahve se nasadí jako kontrola inokula bez přidání chemických látek. Špatně rozpustné látky se odváží nebo odměří přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3.

Podle potřeby se jedna baňka použije ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky, a to přidáním zkoušené i referenční látky ve stejných koncentracích jako v ostatních baňkách.

Podle potřeby se další baňka použije k ověření, zda se zkoušená látka nerozkládá abioticky, přičemž se použije roztok chemické látky bez inokula (viz I.6.6). Sterilizace se provádí přidáním vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 litry přídavkem minerálního média bez CO_2. Podle potřeby lze odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz bod 4 dodatku 2) a/nebo pro specifickou analýzu. Poté se na výstup plynů u baněk připojí absorpční lahve.

V případě použití hydroxidu barnatého se za každou baňku na 5 litrů zařadí tři absorpční lahve, každá obsahující 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ o koncentraci 0,0125 mol/l. Roztok nesmí obsahovat sraženinu síranů a uhličitanu barnatého a jeho koncentrace musí být stanovena bezprostředně před použitím. Je-li použit hydroxid sodný, spojí se dvě absorpční lahve, z nichž druhá slouží jako kontrola, že byl veškerý CO_2 zachycen v první absorpční lahvi. K tomuto účelu se hodí absorpční lahve opatřené sérovými uzávěry. Do každé absorpční lahve se přidá po 200 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/l, což postačuje k absorpci veškerého oxidu uhličitého, který by se uvolnil při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného, i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitanů; korekce se provede odečtením množství uhličitanů ve slepém pokusu.

IV.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IV.2.6. **Provedení zkoušky**

Zkouška se zahájí probubláváním vzduchu bez CO_2 suspensí při průtoku 30–100 ml/min. Za účelem analýzy obsahu CO_2 se pravidelně odebírají vzorky absorbentu. Doporučuje se, aby se v průběhu prvních 10 dnů prováděly analýzy každý druhý až třetí den a dále pak každý pátý den až do 28. dne, což umožní rozpoznat období 10denního období rozkladu.

▼B

28. den se (nepovinně) odebere vzorek pro stanovení DOC a/nebo pro specifickou analýzu, změří se pH suspensí a poté se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl; provzdušňuje se přes noc, aby se odstranil CO_2 přítomný v suspensi. Poslední analýza uvolněného CO_2 se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se provádí stanovení CO_2, se odpojí absorpční lahev s hydroxidem barnatým bližší zkušební baňce a roztok hydroxidu barnatého se titruje 0,05 M HCl za přítomnosti fenolftaleinu jako indikátoru. Zbývající dvě absorpční lahve se posunou k baňce a na konec řady se zařadí nová absorpční lahev se 100 ml čerstvě připraveného 0,0125 M hydroxidu barnatého. Titrace se provádějí podle potřeby, např. je-li pozorována v první absorpční lahvi zřetelná sraženina a před tím, než vznikne viditelná sraženina ve druhé absorpční lahvi, nebo alespoň jednou týdně. Jinou možností je provést při použití NaOH jako absorbentu odběr malého vzorku hydroxidu sodného pomocí injekční stříkačky (podle použitého analyzátoru uhlíku) z absorpční lahve, která je nejblíž k baňce. Vzorek se nastříkne přímo do IC-části analyzátoru uhlíku pro analýzu anorganického uhlíku.

Obsah druhé absorpční lahve se analyzuje pouze na konci zkoušky s cílem stanovit korekci na možný únik CO_2.

IV.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

IV.3.1. **Zpracování výsledků**

Množství CO_2 zachyceného v absorpční lahvi je v případě titračního stanovení dáno vztahem:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl spotřebovaný při titraci 100 ml obsahu absorpční lahve (ml),

C_B = koncentrace roztoku hydroxidu barnatého (mol/l),

C_A = koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové (mol/l).

Je-li CB 0,0125 mol/l a CA 0,05 mol/l, je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ 50 ml a hmotnost CO_2 je dána vztahem:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{počet ml HCl spotřebované při titraci} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

V tomto případě se tedy k přepočtu objemu HCl spotřebovaného při titraci na hmotnost vzniklého CO_2 použije faktor 1,1.

S použitím příslušných výsledků titrace se vypočte hmotnost CO_2 vzniklého ze samotného inokula a inokula se zkoušenou látkou a jejich rozdíl je hmotnost CO_2 vzniklého ze samotné zkoušené látky.

Je-li např. výsledkem titrace samotného inokula 48 ml a inokula se zkoušenou látkou 45 ml, je množství

CO_2 z inokula = 1,1 × (50 – 48) = 2,2 mg,

▼B

CO_2 z inokula a zkoušené látky = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg,

a tedy hmotnost CO_2 vzniklého ze zkoušené látky 3,3 mg.

Biologický rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{ v mg} \times 100}{TCO_2 \times \text{přidaná zkušební látka v mg}}$$

nebo

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{v mg} \times 100}{\text{TCO přidaný ve zkoušce v mg} \times 3,67}$$

přičemž 3,67 je převodní faktor (44/12) pro uhlík a oxid uhličitý.

Rozklad v procentech se po každém období vypočte dosazením hodnoty TCO_2 vypočítané pro každý den až do doby, kdy byl měřen.

Při zachytávání do NaOH se vypočte hmotnost vzniklého CO_2, vyjádřeného jako anorganický uhlík v mg, vynásobením koncentrace anorganického uhlíku v absorpční lahvi objemem absorpčního roztoku.

Rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\%\ ThCO_2 = \frac{\text{anorg. C ze zkušeb. baňky v mg} - \text{anorg. C ze slep. pokusu v mg}}{\text{TOC přidaný jako zkoušená látka v mg}} \times 100$$

Úbytky DOC se (nepovinně) vypočítají podle bodu I.7. Tento výsledek spolu s ostatními výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

IV.3.2. **Platnost výsledků**

Obsah anorganického uhlíku ve zkušební suspensi v minerálním médiu na začátku zkoušky musí být menší než 5 % TC a celkové množství CO_2 vzniklé na konci slepé zkoušky s inokulem nesmí za normálních okolností překročit 40 mg na litr média. Jsou-li hodnoty větší než 70 mg CO_2 na litr, měla by být data i experimentální postup kriticky přehodnoceny.

Viz také I.5.2.

IV.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

IV.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

▼B

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu: … mg/l

Celkové množství uhlíku přidaného do baňky: … mg C

TCO_2: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: … mg/l

Čas (dny)	CO_2 uvolněný ve zkoušce (mg)		CO_2 uvolněný ve slepé zkoušce (mg)		Celkové množství CO_2 (průměr ve zkoušce minus průměr ve slepé zkoušce) (mg)		TCO_2 kumulativní $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	průměr	3 / 4	průměr	1	2	1	2	průměr
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Poznámka: podobný formulář lze použil i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus ($mg \cdot l^{-1}$)	Zkoušená látka ($rng.l^{-1}$)
0	$C_{b(o)}$	C_O
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t

([1]) nebo na konci kultivace.

▼B

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{CO_2 - \text{tvorba CO2 ve steril. podm. po 28 dnech v mg}}{TCO_2} \times 100$$

ČÁST V. **ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ** (metoda C.4-D)

V.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené chemické látky (100 mg zkoušené látky na litr, dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr), která je jediným zdrojem organického uhlíku, se míchá v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) po dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanoví buď měřením množství kyslíku (elektrolyticky produkovaného), který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce, nebo ze změn objemu nebo tlaku (nebo obojího) v aparatuře. Uvolněný CO_2 se jímá v roztoku hydroxidu draselného nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, které je zkoušenou látkou spotřebováno (korigované na spotřebu kyslíku inokulem ve slepé zkoušce, která se provádí současně), se vyjádří v procentech TSK nebo CHSK. Popřípadě může být z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace vypočten primární biologický rozklad a z analýzy DOC úplný biologický rozklad.

V.2. POPIS METODY

V.2.1. **Přístroje**

a) vhodný respirometr;

b) regulátor teploty s přesností na ± 1 °C nebo lepší;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

V.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. **Příprava baněk**

S použitím zásobních roztoků se připraví samostatné sady roztoků zkoušené chemické látky a referenční chemické látky v minerálním médiu o koncentraci odpovídající obvykle 100 mg chemické látky na litr (dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr).

▼B

TSK se vypočte z tvorby amoniových solí, pokud lze vyloučit nitrifikaci, v opačném případě by měl být výpočet založen na tvorbě dusičnanů (viz bod 2 dodatku 2).

Změří se pH a v případě potřeby se upraví na 7,4 ± 0,2.

Špatně rozpustné látky se přidají v pozdějším stádiu (viz dále).

Má-li se stanovit toxicita zkoušené látky, připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční i zkoušenou látku, a to ve stejných koncentracích jako v roztocích obsahujících jen jednu látku.

Požaduje-li se stanovení fyzikálně-chemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkoušené látky obvykle o koncentraci 100 mg TSK na litr sterilizovaný přídavkem vhodné toxické látky (viz I.6.6).

Připravené objemy roztoků zkoušené a referenční chemické látky se rozdělí alespoň duplicitně do baněk. Do dalších baněk se přidá pouze minerální médium (pro kontrolu inokula) a podle potřeby směs roztoku zkoušené a referenční chemické látky a sterilní roztok.

Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná, odváží se nebo odměří v tomto stadiu přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3. Do lahví pro absorpci CO_2 se přidá hydroxid draselný, pelety hydroxidu sodného nebo jiný absorbent.

V.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

V.2.6. **Provedení zkoušky**

V baňkách se nechá ustavit požadovaná teplota a vybrané baňky se inokulují přidáním aktivovaného kalu nebo jiného zdroje inokula, aby nebyla koncentrace suspendovaných látek větší než 30 mg/l. Zařízení se sestaví, spustí se míchačka, přezkouší se na vzduchotěsnost a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není třeba věnovat zkoušce žádnou zvláštní pozornost, kromě nezbytných odečtů a denní kontroly teploty a míchání.

Z pravidelných častých odečtů se podle postupu uvedeného výrobcem zařízení vypočte spotřeba kyslíku. Na konci inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách, a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK_{NH4} (platí pro látky obsahující dusík).

▼B

V případě potřeby se na začátku a na konci odebírá vzorek z respiračních nádobek pro stanovení DOC nebo pro specifickou analýzu (viz bod 4 dodatku 2). Při počátečním odběru z baňky se zajistí, aby byl znám objem zkušební suspense, která v baňce zůstala. Je-li kyslík spotřebováván látkami obsahujícími dusík, stanoví se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů za 28 dnů a vypočte se korekce na spotřebu kyslíku nitrifikací (dodatek 5).

V.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

V.3.1. **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu kyslíku inokulem za stejnou dobu ve slepé zkoušce) se podělí hmotností zkoušené látky v baňce. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg chem. látky)})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg TSK}(\text{mg O2 na mg chem. látky}))} \times 100$$

nebo z rovnice:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg chem. látky)})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg COD (mg O2 na mg chem. látky)})} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

V případě, že se provádí nepovinné stanovení organického uhlíku a/nebo specifické chemické látky, vypočte se stupeň rozkladu podle bodu I.7.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

V.3.2. **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

▼B

V.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

V.4. **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku:... mg/l

Počáteční koncentrace v médiu, C_0:... mg/l

Objem zkušební baňky (V):... ml

TSK nebo CHSK:... v mg O_2/mg zkoušené látky (NH_4 nebo NO_3)

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg/l

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	1												
	2												
	a, průměr												
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	3												
	4												
	b, průměr												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mu zkoušené látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	$D_{1\ (a1)}$												
	$D_{2\ (a2)}$												
	Průměr ([1])												

V = objem média ve zkušební baňce
([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, je-li mezd nimi výrazný rozdil.

Poznámka: Podobný formulát lze použit i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Den		0	28	Rozdíl
i)	Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)			M
ii)	Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Koncentrace dusitanů (mg N na litr)			(N)
iv)	Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii+iv)	Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepá zkouška (mg· l^{-1})	Zkoušená látka (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_o)
28 ([1])	(C_{blt})	(C_t)

([1]) nebo na konci inkubace

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ ANALÝZA** (nepovinné)

S_b = koncentrace ve fyzikálně-chemické kontrole (sterilní) po 28 dnech,

S_a = koncentrace v inokulované baňce po 28 dnech.

$$\text{biologický rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

a = spotřeba kyslíku ve sterilních baňkách po 28 dnech v mg

$$\text{spotřeba kyslíku na mg zkoušené chemické látky} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(viz oddíl 1 a 3)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ČÁST VI. **ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH**
(metoda C.4-E)

VI.1. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkoušené látky v minerálním médiu, obvykle o koncentraci 2–5 mg/l, se inokuluje malým množstvím mikroorganismů ze směsné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvičkách, v temnu a při konstantní teplotě. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím analýzy rozpuštěného kyslíku. Množství spotřebovaného kyslíku po korekci na souběžnou slepou zkoušku s inokulem se vyjádří jako TSK nebo CHSK.

VI.2. POPIS METODY

VI.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) lahve pro analýzu BSK se skleněnými zátkami, např. na 250 až 300 ml;

b) vodní lázeň nebo inkubátor pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) v temnu;

c) velké skleněné lahve na 2–5 litry pro přípravu média a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK;

d) kyslíková elektroda a oxymetr nebo vybavení a činidla pro Winklerovu titrační metodu.

VI.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se po 1 ml roztoků a) až d) a doplní se vodou na 1 litr.

VI.2.3. **Příprava inokula**

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Obvykle se použije jedna kapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na litr média; k nalezení optimálního objemu dané odpadní vody může být nezbytné provést pokusy (viz I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. **Příprava baněk**

Minerální médium se alespoň 20 minut silně provzdušňuje. Všechny série zkoušek se provedou s minerálním médiem ze stejné dávky. Obecně je médium připraveno k použití po 20 hodinách stání při zkušební teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu; jeho obsah by měl být asi 9 mg/l při 20 °C. Všechny operace přenosu média nasyceného vzduchem a jeho plnění se provedou tak, aby nevznikaly bublinky, např. pomocí nasávaček.

▼B

Připravují se shodné skupiny lahviček pro analýzu BSK pro stanovení se zkoušenou látkou a referenční látkou v souběžných sériích experimentů. Připraví se dostatečný počet lahviček, včetně slepých pokusů, tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu, např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů, bylo možné provést alespoň dvě měření spotřeby kyslíku. K tomu, aby bylo možné rozpoznat 10denní období rozkladu, může být potřeba více lahviček.

Velké lahve se přibližně do jedné třetiny naplní provzdušněným médiem. Poté se zvlášť do jednotlivých velkých lahví přidá dostatečný objem zásobního roztoku zkoušené látky a referenční látky, a to obvykle tak, aby nebyla konečná koncentrace chemických látek větší než 10 mg/l. Ke slepému pokusu v další velké lahvi se nepřidávají žádné chemické látky.

S cílem zajistit, aby aktivita inokula nebyla omezená, nesmí koncentrace kyslíku v lahvičkách pro analýzu BSK klesnout pod 0,5 mg/l. Toto omezuje koncentraci zkoušené látky na 2 mg/l. Pro látky, které se špatně rozkládají, a pro látky s nízkou hodnotou TSK lze použít koncentraci 5–10 mg/l. V některých případech se doporučuje provést souběžné série měření při dvou různých koncentracích zkoušené látky, např. při 2 a 5 mg/l. Obvykle se TSK počítá na základě tvorby amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace nebo kdy dochází k nitrifikaci, se TSK vypočte na základě tvorby dusičnanů (TSK_{NO3}, viz bod 2 dodatku 2). V případech, kdy nitrifikace není úplná, se provede korekce na změny analyticky stanovených koncentrací dusitanů a dusičnanů (viz dodatek 5).

Má-li být vyšetřena toxicita zkoušené látky (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), je nezbytné nasadit další sérii lahviček.

Připraví se další velká láhev s provzdušněným minerálním médiem (naplněná asi do jedné třetiny objemu), do které se přidá zkoušená a referenční chemická látka o konečné koncentraci obvykle stejné jako v případě ostatních velkých lahví.

Roztoky ve velkých lahvích se inokulují výstupem z druhého stupně čistírny odpadních vod (jedna kapka nebo 0,05 až 5 ml/l) nebo z jiného zdroje inokula, jako je např. říční voda (viz I.6.4.2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným minerálním médiem za použití hadičky, která sahá na dno, aby se dosáhlo dostatečného promíchání.

VI.2.5. **Počet lahviček v typické zkoušce**

V typické zkoušce se použijí tyto lahvičky:

— nejméně 10 lahviček se zkoušenou látkou a inokulem (zkušební suspense),

— nejméně 10 lahviček pouze s inokulem (slepá zkouška s inokulem),

— nejméně 10 lahviček s referenční látkou a inokulem (kontrolní zkouška postupu),

▼B

— a podle potřeby 6 lahviček se zkoušenou látkou, referenční látkou a inokulem (kontrola toxicity). Pro rozpoznání 10denního období rozkladu je však potřebný dvojnásobný počet lahviček.

VI.2.6 Provedení zkoušky

Všechny připravené roztoky se ihned po přípravě rozdělí do příslušné skupiny lahviček pro analýzu BSK, a to pomocí hadičky zavedené do spodní čtvrtiny velké lahve (nikoliv ke dnu) tak, aby se všechny lahvičky pro analýzu BSK zcela naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. V lahvičkách se Winklerovou metodou nebo pomocí oxymetru ihned stanoví obsah rozpuštěného kyslíku k počátku zkoušky (k času nula). Obsah lahviček lze konzervovat pro pozdější analýzu přídavkem síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvním Winklerovým činidlem). Před provedením zbývajících kroků Winklerovy metody se pečlivě uzavřené lahvičky obsahující kyslík vázaný ve formě hydratovaného oxidu manganitého skladují v temnu nejdéle 24 hodin při teplotě 10–20 °C. Zbývající souběžně připravené lahvičky se uzavřou tak, aby v nich nezůstaly bublinky vzduchu, a inkubují se v temnu při 20 °C. Každá série musí být doprovázena úplnou sérií slepého pokusu s inokulovaným médiem. Ve všech sériích se během 28 dnů inkubace v pravidelných intervalech (nejméně jednou týdně) stanoví alespoň ve dvou lahvičkách obsah rozpuštěného kyslíku.

Týdenní vzorky umožní stanovení rozkladu v procentech ve 14denním období rozkladu, zatímco vzorky odebírané každé 3–4 dny umožní rozpoznat 10denní období rozkladu, což vyžaduje dvojnásobný počet lahviček.

U látek obsahujících dusík se provede korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci. K tomuto účelu se stanoví koncentrace rozpuštěného kyslíku oxymetrem a poté se z lahvičky pro analýzu BSK odebere vzorek pro stanovení dusitanů a dusičnanů. Z přírůstku koncentrace dusitanů a dusičnanů se vypočte množství spotřebovaného kyslíku (viz dodatek 5).

VI.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VI.3.1. **Zpracování výsledků**

Nejprve se vypočte BSK, ke které došlo po každé časové periodě, a to odečtením spotřeby kyslíku (v mg O_2/litr) ve slepém pokusu s inokulem od spotřeby zkoušenou chemickou látkou. Takto korigovaná spotřeba se vydělí koncentrací zkoušené látky (mg/l) a získá se specifická BSK v mg kyslíku na mg zkoušené látky. Biologická rozložitelnost v procentech se vypočte jako podíl specifické BSK a specifické TSK (vypočtené podle bodu 2 dodatku 2) nebo CHSK (stanovené analyticky, viz bod 3 dodatku 2), tedy:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep. pokusu v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

▼B

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{ThOD(mg } O_2\text{/mg TSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

nebo

$$\text{Rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{COD(mg } O_2\text{/mg COD (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

VI.3.2. **Platnost výsledků**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu s inokulem by neměla být po 28 dnech vyšší než 1,5 mg/l. Vyšší hodnoty vyžadují přešetření experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku ve zkušebních lahvičkách by neměla nikdy klesnout pod 0,5 mg/l. Takto nízké úrovně kyslíku jsou platné pouze tehdy, lze-li použitou metodou stanovení rozpuštěného kyslíku tak nízké úrovně přesně změřit.

Viz také I.5.2.

VI.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VI.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

Počáteční koncentrace v lahvičce: … mg/l

TSK nebo CHSK: v mg O_2/mg zkoušené látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

▼B

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace v reakční směsi: … mg/l

5. **STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU**

Metoda: Winklerova metoda/oxymetr

Analýzy lahviček

Doba kultivace (d}			Rozpuštěný kyslík (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
(bez chemické látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkoušená chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Doba kultivace		0	n_1	n_2	n_3
i)	Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)				
ii)	Změna koncentrace dusičnanů (mg N na litr)	—			
iii)	Kyslíkový ekvivalent (mg. l^{-1})	—			
iv)	Koncentrace dusitanů (mg N na litr)				
v)	Změna koncentrace dusitanů (mg N na litr)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg· l^{-1})	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg· l^{-1})	—			

7. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH**

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
LAHVIČKA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
LAHVIČKA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
LAHVIČKA 2 $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
průměr (1) $\%\ D = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(1) Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

m_{to} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase 0

m_{tx} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase x

m_{bo} = hodnota pro slepý pokus v čase 0

m_{bx} = hodnota pro slepý pokus v čase x

Použijí se rovněž korekce na nitrifikaci z bodu iii + vi v oddílu 6.

8. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLEPÉM POKUSU**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu je: ($m_{b0} - m_{b28}$) v mg/l. Tato spotřeba je důležitá pro platnost zkoušky. Měla by být menší než 1,5 mg/l.

ČÁST VII. **ZKOUŠKA MITI** (Metoda C.4-F)

VII.1. PODSTATA METODY

Měření spotřeby kyslíku v míchaném roztoku nebo suspensi zkoušené chemické látky v minerálním médiu inokulovaném speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů se provádí automaticky po dobu 28 dnů za tmy v uzavřeném respirometru při 25 ± 1 °C. Uvolňovaný oxid uhličitý se jímá v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost se vyjádří jako spotřeba kyslíku (korigovaná na slepý pokus) vyjádřená v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Primární biologická rozložitelnost vyjádřená v procentech se rovněž vypočte z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace, popřípadě z analýzy DOC.

VII.2. POPIS METODY

VII.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr standardně vybavený 6 baňkami na 300 ml opatřenými uzávěry obsahujícími absorbent CO_2;

▼B

b) místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň nastavená na 25 ± 1 °C;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

VII.2.2. **Příprava minerálního média**

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky (I.6.1):

a)	Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Chlorid amonný, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
	PH roztoku musí být 7,2.	
b)	Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
c)	Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	

Spojí se po 3 ml roztoků a), b), c), a d) a doplní se na 1 litr.

VII.2.3. **Příprava inokula**

Odeberou se čerstvé vzorky nejméně z deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemické látky. Z míst, jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řeky, jezera a moře, se odeberou litrové vzorky kalu, povrchových půd, vody atd., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyplavených látek a ustálení se pH supernatantu upraví na 7 ± 1 hydroxidem sodným nebo kyselinou fosforečnou.

Vhodným objemem filtrovaného supernatantu se naplní nádoba na aktivaci kalu a kapalina se 23,5 hodiny provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije přibližně jedna třetina celkového objemu supernatantu a k usazenému materiálu se přidá stejný objem roztoku (pH 7), který obsahuje vždy po 0,1 % glukosy, peptonu a dihydrogenfosforečnanu draselného, a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad správné laboratorní praxe: odtok má být čirý, teplota má být udržována při 25 ± 2 °C, pH má být 7 ± 1, kal se má dobře usazovat, provzdušňování musí být za všech okolností dostatečné, mají být přítomni prvoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé tři měsíce. Inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace, ale ne později než po čtyřech měsících. Proto se v pravidelných intervalech jednou za tři měsíce odebírají vzorky z 10 míst.

▼B

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant aktivovaného použitého kalu mísí se stejným objemem filtrovaného supernatantu čerstvě odebraného kalu pocházejícího z deseti zdrojů a směs se kultivuje podle výše uvedeného postupu. Kal se použije jako inokulum až 18–24 hodin po uvedeném zpracování.

VII.2.4. **Příprava baněk**

Připraví se těchto 6 baněk:

Baňka č. 1: zkoušená chemická látka v ředicí vodě, 100 mg/l

Baňka č. 2, 3 a 4: zkoušená chemická látka v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 5: referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 6: pouze minerální médium

Špatně rozpustné chemické látky se odváží nebo odměří, nebo se zpracují podle dodatku 3, s výjimkou těch, u nichž nesmějí být použita rozpouštědla ani emulgátory. Do speciálních uzávěrů všech lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

VII.2.5. **Provedení zkoušky**

Baňky č. 2, 3 a 4 (zkušební suspense), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus s inokulem) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby byla výsledná koncentrace kalu 30 mg/l. Do lahve č. 1 se inokulum nepřidává, slouží jako abiotická kontrola. Zařízení se sestaví, přezkouší se na vzduchotěsnost, spustí se míchačka a v temnu se zahájí měření spotřeby kyslíku. Denně se kontroluje teplota, míchání, coulometrický zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenají se všechny změny barvy obsahu baněk. Spotřeba kyslíku pro 6 baněk se odečítá přímo, např. šestikanálovým zapisovačem, čímž se získá křivka BSK. Na konci kultivace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách a stanoví se zbytková koncentrace zkoušené chemické látky a jejích produktů rozkladu a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také koncentrace DOC (postup podle bodu 4 dodatku 2). Zvláštní pozornost je třeba věnovat těkavým látkám. Pokud se předpokládá nitrifikace, stanoví se podle možnosti koncentrace dusičnanů a dusitanů.

VII.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VII.3.1. **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu inokulem za stejnou dobu ve slepém pokusu) se podělí hmotností použité zkoušené látky. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

▼B

Biologický rozklad v procentech se potom vypočte z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \text{\% ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ BSK (mg O2 na mg chem. látky))}}{\text{ThOD (mg } O_2 \text{ TSK(mg O2 na mg chem. látky))}} \times 100$$

Pro směsi se TSK vypočte z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché sloučeniny. Použije se odpovídající hodnota TSK (TSK_{NH4} nebo TSK_{NO3}) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

Vypočte se primární biologický rozklad v procentech z úbytku specifické (výchozí) chemické látky (viz I.7.2):

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta zkoušené chemické látky v baňce č. 1, zaznamená se to a jako koncentrace zkoušené látky (S_b) po 28 dnech se pro výpočet biologické rozložitelnosti dosadí tato koncentrace.

Stanovuje-li se koncentrace DOC (nepovinné), vypočte se konečná hodnota biologického rozkladu v procentech podle vztahu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

jak je uvedeno v bodě I.7.1. Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta DOC v baňce č. 1, použije se při výpočtu biologického rozkladu v procentech tato koncentrace DOC.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

VII.3.2. **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

Pokud procenta rozkladu anilinu vypočítaná ze spotřeby kyslíku nepřekročí 40 % po 7 dnech a 65 % po 14 dnech, test je považován za neplatný.

VII.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VII.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MITI (I)

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

▼B

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

Počáteční koncentrace v médiu, C_0: … mg/l

Objem reakční směsi, V: … ml

TSK: mg O_2/litr

4. **INOKULUM**

Místa odběru kalu:

1. … 6. …
2. … 7. …
3. … 8. …
4. … 9. …
5. … 10. …

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci se syntetickými splašky = … mg/l.

Objem aktivovaného kalu v litru konečného média = … ml

Koncentrace kalu v konečném médiu = … mg/l

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

Typ použitého respirometru:

			Čas {dny)				
			0	7	14	il	2S
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	b						
Korigovaná spotřeba O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$						
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Baňka 1					
		Baňka 2					
		Baňka 3					
Rozklad v % BOD $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Průměr ([1])					

([1]) Hodnoty nelze průměrovat. je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

▼B

Poznámka: podobný formulár lze použít i pro referenční látku.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC				úbytek DOC v %	Průměr
	Naměřená hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + zkoušená látka	a				—	—
Kal + zkoušená látka	b_1		$b_1 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_2		$b_2 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolní slepá zkouška	c		—		—	—

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA ZE SPECIFICKÉ CHEMICKÉ ANALÝZY**

	Zbytkové množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky	Rozklad v %
Slepá zkouška s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Rozklad v % se vypočte pro baňky a1, a2, a3.

8. **POZNÁMKY**

Připojí se křivka závislosti BSK na čase, je-li k dispozici.

▼B

DODATEK 1

ZKRATKY A DEFINICE

DO: Rozpuštěný kyslík (dissolved oxygen) (mg/l) je koncentrace kyslíku, který je rozpuštěn ve vodném vzorku.

BSK: Biochemická spotřeba kyslíku (biochemical oxygen demand, BOD) (g) je množství kyslíku, jež je v průběhu metabolizace zkoušené látky spotřebováno mikroorganismy; vyjadřuje se také jako spotřeba kyslíku v gramech na gram zkoušené látky (viz metoda C.5).

CHSK: Chemická spotřeba kyslíku (chemical oxygen demand, COD) (g) je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkoušené látky horkým kyselým dichromanem; je měřítkem množství přítomných oxidovatelných látek; vyjadřuje se také v gramech kyslíku spotřebovaného na gram zkoušené látky (viz metoda C.6).

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo zůstane v supernatantu po odstřeďování po dobu 15 minut při zrychlení 40 000 m/s^2 (asi 4 000 g).

TSK: Teoretická spotřeba kyslíku (theoretical oxygen demand, ThOD) (mg) je celkové množství kyslíku nezbytné pro úplnou oxidaci chemické látky; vypočte se z molekulového vzorce látky (viz bod 2 dodatku 2) a vyjadřuje se také jako množství kyslíku v mg nezbytné na mg zkoušené látky.

TCO_2: Teoretický oxid uhličitý (theoretical carbon dioxide, $ThCO_2$) je množství oxidu uhličitého, které bymělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.

TOC: Celkový organický uhlík (total organic carbon) ve vzorku je součtem organického uhlíku v roztoku a v suspensi.

IC: Anorganický uhlík (inorganic carbon).

TC: Celkový uhlík (total carbon) je součtem organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky způsobené biologickým působením, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxiduuhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Snadno biologicky rozložitelná:

je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

▼B

Biologicky rozložitelná:

je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Odstranitelnost:

je náklonnost látek k jejich odstranění při biologickém čištění odpadních vod, aniž by byl nepříznivě ovlivněn normální průběh čisticích pochodů. Látky snadno biologicky rozložitelné jsou obecně odstranitelné, avšak ne všechny rozložitelné látky jsou odstranitelné. Mohou zde působit také abiotické procesy.

Fáze iniciace:

je doba, ve zkoušce na úbytek rozpuštěného organického uhlíku, od inokulace do dosažení alespoň 10 % biologického rozkladu. Fáze iniciace je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce fáze zdržení do dosažení 90 % maximální dosažitelné úrovně rozkladu.

10denní období rozkladu:

je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % rozkladu.

▼B

DODATEK 2

VÝPOČET A STANOVENÍ NĚKTERÝCH SOUHRNNÝCH PARAMETRŮ

V závislosti na zvolené zkušební metodě se vyžaduje určení některých souhrnných parametrů. V následujícím oddíle je popsán výpočet těchto hodnot. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. **Obsah uhlíku**

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví analýzou prvků ve zkoušené látce.

2. **Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)**

Teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) lze vypočítat ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků analýzy prvků. Pro látku

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikace

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW} mg/mg$$

nebo s nitrifikací

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW} mg/mg$$

3. **Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)**

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví metodou C.6.

4. **Rozpuštěný organický uhlík (DOC)**

Rozpuštěným organickým uhlíkem je podle definice organický uhlík přítomný ve vodném roztoku chemické látky nebo směsi, který projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

Odeberou se vzorky ze zkušebních nádob a ihned se filtrují pomocí filtračního zařízení s vhodným membránovým filtrem. Prvních 20 ml (toto množství může být při použití malých filtrů zmenšeno) se odstraní. 10–20 ml, nebo v případě nástřiku menší objem (objem závisí na množství potřebném pro analýzu), se uschová pro analýzu uhlíku. Koncentrace DOC se stanoví pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, která je menší nebo rovna 10 % počáteční koncentrace DOC použité ve zkoušce.

Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tedy může obsahovat až několik mg rozpustného organického uhlíku, který může ovlivnit stanovení biologické rozložitelnosti. Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením třikrát jednu hodinu v deionizované vodě. Filtry lze poté skladovat 1 týden ve vodě. Při použití filtračních patron pro jedno použití se musí u každé šarže ověřit, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

▼B

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkoušené látky na filtru. Doporučuje se ověřit, zda k adsorpci zkoušené chemické látky na filtru nedochází.

Místo filtrace lze použít k rozlišení TOC od DOC odstřeďování při 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (4 000 g) po dobu 15 minut. Tato metoda však není spolehlivá při počáteční koncentraci DOC < 10 mg/l, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

DODATEK 3

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ŠPATNĚ ROZPUSTNÝCH LÁTEK

Při zkouškách biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Zatímco odběr vzorků homogenních kapalin je problémem jen zřídka, u pevných látek se doporučuje provést homogenizaci vhodnými prostředky, aby v důsledku nehomogenity nedošlo k chybám. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům reprezentativních vzorků o několika miligramech ze směsí látek, které obsahují velké množství nečistot.

V průběhu zkoušek lze použít různé způsoby míchání. Je třeba věnovat pozornost tomu, aby míchání bylo přiměřené právě pro udržení látky v disperzi a nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pěnění a nadměrným třecím silám.

Může se použít emulgátor vytvářející stálé disperzi chemické látky. Nesmí být toxický pro bakterie a nesmí se biologicky rozkládat nebo pěnit za zkušebních podmínek.

Stejná kritéria jako pro emulgátory platí i pro rozpouštědla.

U pevných zkoušených látek se nedoporučuje používat pevné nosiče, mohou však být vhodné v případě olejovitých látek.

Použijí-li se pomocné látky, jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče, musí být proveden slepý pokus s pomocnou látkou.

Pro studium biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek lze použít kteroukoli ze tří respirometrických zkoušek (zkouška na úbytek CO_2, na BSK, zkouška MITI).

LITERATURA

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

DODATEK 4

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK POTENCIÁLNĚ TOXICKÝCH PRO INOKULUM

Je-li chemická látka podrobena zkoušení snadné biologické rozložitelnosti a jeví se jako biologicky nerozložitelná, doporučuje se postupovat při požadavku rozlišit inhibiční působení od odolnosti látky vůči rozkladu následujícím způsobem (Reynolds et al., 1987).

Ve zkouškách toxicity i ve zkouškách biologické rozložitelnosti se použijí podobná nebo stejná inokula.

K posouzení toxicity chemických látek zkoušených ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu (směrnice 88/302/EHS), stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Nemá-li dojít k inhibici z důvodu toxicity, měla by být koncentrace zkoušené látky použitá ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti menší než 1/10 hodnoty EC_{50} (nebo menší než EC_{20}) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s EC_{50} > 300 mg/l pravděpodobně nemají při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti toxické účinky.

Hodnoty EC_{50} < 20 mg/l mohou při následném zkoušení působit potíže. Měly by být použity nízké koncentrace, což vyžaduje použít přísné a citlivé zkoušky v uzavřených lahvičkách nebo materiál značený ^{14}C. Použití vyšších koncentrací zkoušené látky může být popřípadě umožněno nasazením aklimatizovaného inokula. V tomto případě se však ztrácí specifické kritérium zkoušky snadné biologické rozložitelnosti.

LITERATURA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

DODATEK 5

KOREKCE NA SPOTŘEBU KYSLÍKU PŘI NITRIFIKACI

Chyby způsobené tím, že při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, není vzata v úvahu nitrifikace, nejsou významné (nejsou větší než 5 %), i když je oxidace amoniakálního dusíku ve zkušebních nádobách a ve slepém pokusu nepravidelná. U zkoušených látek obsahujících dusík může dojít ke značným chybám.

Dochází-li k nitrifikaci, avšak nikoli úplné, musí být spotřeba kyslíku reakční směsí korigována na množství kyslíku spotřebovaného na oxidaci amoniaku a amonných iontů na dusitany a dusičnany, jsou-li změny koncentrace dusitanů a dusičnanů během kultivace stanoveny pomocí těchto rovnic:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Celkově:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Podle rovnice 1 je spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, tzn., že přepočítávací faktor je 3,43 (96/28). Stejně tak je podle rovnice 3 spotřeba kyslíku při oxidaci na dusičnan 128 g, tzn. přepočítávací faktor je 4,57 (128/28).

Protože popsané reakce následují po sobě, přičemž jsou realizovány odlišnými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat; při poklesu roste odpovídajícím způsobem koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku při tvorbě dusičnanů se tedy vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, zatímco spotřeba kyslíku při tvorbě dusitanů se vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusitanů faktorem 3,43, nebo při poklesu obsahu dusitanů se ztráty kyslíku vypočtou vynásobením poklesu koncentrace faktorem - 3,43.

To znamená:

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusičnanů = 4,57 × přírůstek koncentrace dusičnanů (4)

a

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusitanů = 3,43 × přírůstek koncentrace dusitanů (5)

a

O_2 při úbytku dusitanů: = - 3,43 × pokles koncentrace dusitanů (6)

Tedy

spotřeba O_2 při nitrifikaci = ± 3,43 × změna koncentrace dusitanů + 4,57 × změna koncentrace dusičnanů (7)

a tedy

spotřeba O_2 při oxidaci uhlíku = celková zjištěná spotřeba – spotřeba při nitrifikaci (8)

Jestliže se stanoví pouze celkový oxidovaný dusík, bude se v prvním přiblížení rovnat spotřeba kyslíku při nitrifikaci hodnotě 4,57 × přírůstek koncentrace oxidovaného dusíku.

Korigovaná hodnota spotřeby kyslíku při oxidaci uhlíku se poté porovná s TSK NH_3 vypočtenou podle dodatku 2.

▼B

C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. METODA

1.1. ÚVOD

Metoda je určena pro měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) pevných nebo kapalných organických látek.

Data získaná při této zkoušce platí pro látky rozpustné ve vodě; těkavé látky a látky s nízkou rozpustností ve vodě lze touto metodou alespoň v zásadě rovněž zkoušet.

Metodu lze použít pouze pro organické látky, které nemají v koncentracích používaných při zkoušce inhibiční účinek na bakterie. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, může být nezbytné použít pro dosažení dobré dispergace zkoušeného materiálu zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Informace o toxicitě chemické látky mohou být užitečné při interpretaci nízkých hodnot výsledku zkoušky a při volbě vhodných zkoušených koncentrací.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je definována jako množství rozpuštěného kyslíku, které je nutné k biochemické oxidaci určitého objemu roztoku látky za předepsaných podmínek.

Výsledky se vyjadřují v gramech spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Je žádoucí použít vhodnou referenční látku pro kontrolu aktivity inokula.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném, dobře provzdušněném médiu se inokuluje mikroorganismy a kultivuje se v temnu za stálé, definované teploty.

BSK se stanoví z rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku na začátku a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně pět dní a nejdéle 28 dní.

Souběžně musí být provedena slepá zkouška bez obsahu zkoušené látky.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Stanovení BSK nelze považovat za ověřené stanovení biologické rozložitelnosti látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za screenigovou zkoušku.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se předběžný roztok nebo disperse zkoušené látky o koncentraci vhodné pro použitou metodu. Poté se stanoví BSK některou vhodnou národní nebo mezinárodní standardizovanou metodou.

▼B

2. **DATA A HODNOCENÍ**

BSK předběžného roztoku se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na BSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se použitá metoda.

Biochemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří platných měření.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav, toxické účinky a vlastní složení zkoušené látky.

Použití přísad pro inhibici biologické nitrifikace musí být uvedeno.

4. LITERATURA

Seznam příkladů standardizovaných metod:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. METODA

1.1. ÚVOD

Metoda je určena pro měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) pevných nebo kapalných organických látek prováděné standardním dohodnutým způsobem za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků jsou užitečné informace o chemickém vzorci látky (např. zda jde o soli halogenů, železnaté soli organických sloučenin, organické sloučeniny chloru).

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky, která se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyslíku oxidačního činidla spotřebovaného látkou za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Výsledek se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku (COD) v gramech na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vodě se za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru oxiduje dichromanem draselným v prostředí koncentrované kyseliny sírové pod zpětným chladičem. Přebytečný dichroman se stanoví titrací odměrným roztokem síranu amonnoželeznatého.

U látek obsahujících chlór se pro omezení rušení chloridy přidává síran rtuťnatý ([1]).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Vzhledem k dohodnutým podmínkám stanovení je CHSK „ukazatelem oxidovatelnosti“ a jako takový se používá pro hodnocení organických látek.

Ve zkoušce mohou rušit chloridy; na stanovení CHSK mohou mít rovněž vliv anorganické redukční a oxidační látky.

U některých cyklických sloučenin a u řady těkavých sloučenin (např. u nižších mastných kyselin) nedochází v této zkoušce k úplné oxidaci.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se počáteční roztok nebo disperse látky tak, aby bylo dosaženo CHSK od 250 do 600 mg/l.

([1]) S roztoky obsahujícími rtuť se po použití nakládá tak, aby nedošlo k průniku rtuti do životního prostředí.

▼B

Poznámky:

U špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek lze jemně rozmělněnou látku nebo kapalinu v množství odpovídajícím 5 mg CHSK odvážit a vpravit přímo do experimentální aparatury s vodou.

Často je výhodné, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit CHSK upravenou metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnávačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto upravenou metodou lze často úspěšně kvantifikovat i látky, u nichž je stanovení konvenční metodou obtížné – např. kyselinu octovou. Metoda však také selhává v případě pyridinu. Zvýší-li se koncentrace dichromanu draselného předepsaná v (1) na 0,25 N (0,0416 M), usnadní se přímé navažování 5–10 mg látky, což je důležité pro stanovení CHSK látek obtížně rozpustných ve vodě (2).

Jinak se CHSK stanoví vhodnou národní nebo mezinárodní metodou.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

CHSK obsahu experimentální baňky se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na CHSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se odkaz na použitou metodu.

Chemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří měření. Jsou-li známy, musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav a základní vlastnosti zkoušené látky.

Uvede se použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chloridy.

4. **LITERATURA**

1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Seznam příkladů normovaných metod:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH

1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá pokynům OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemikálie mohou vstupovat do povrchových vod cestami, jako je přímá aplikace, rozprášený postřik, odplavení, odvodňování, zneškodňování odpadu, průmyslové odpadní vody, odpadní vody z domácností a ze zemědělství a atmosférické depozice, a v těchto vodách se mohou chemickými (např. hydrolýza, oxidace), fotochemickými a/nebo mikrobiálními procesy měnit. Tyto pokyny popisují laboratorní zkušební metody pro hodnocení abiotických hydrolytických přeměn chemikálií ve vodních systémech při hodnotách pH běžně se nacházejících v životním prostředí (pH 4–9), přičemž vycházejí ze stávajících pokynů (1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7).

Pokusy se provádějí pro stanovení i) rychlosti hydrolýzy zkoušené látky jako funkce pH a ii) identity nebo povahy a rychlosti tvorby a rozkladu produktů hydrolýzy, kterým mohou být organismy vystaveny. Tyto studie lze požadovat pro chemikálie, které se aplikují přímo do vody, nebo u nichž existuje pravděpodobnost, že vniknou do životního prostředí jinými než výše popsanými cestami.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Viz příloha 2.

1.3. VHODNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato metoda je obecně použitelná na chemické látky (radioizotopově neznačené nebo značené), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná na slabě těkavé a netěkavé směsi dostatečné rozpustnosti ve vodě. Zkouška by se neměla používat na chemikálie, které jsou vysoce těkavé z vody (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy udržovat v roztoku za experimentálních podmínek této zkoušky. Zkouška může být obtížně proveditelná v případě látek s minimální rozpustností ve vodě (8).

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Sterilní vodní pufrační roztoky různých hodnot pH (pH 4, 7 a 9) se podrobují chemickému působení zkušební látkou a inkubují v temnu za regulovaných laboratorních podmínek (při konstantních teplotách). Po příslušném časovém intervalu se pufrační roztoky analyzují pro přítomnost zkoušené látky a produktů hydrolýzy. Látkovou bilanci lze snadněji stanovit u radioizotopově značených zkoušených látek (např. ^{14}C).

Tato zkušební metoda je navržena jako stupňovitý přístup, dále uvedený a vysvětlený v příloze 1. Každý stupeň závisí na výsledcích předchozího stupně.

▼B

1.5. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro měření rychlosti hydrolýzy lze použít radioizotopově neznačených nebo značených zkoušených látek. Pro studium způsobu hydrolýzy a pro stanovení hmotnostní bilance se obvykle dává přednost radioizotopově značené látce. Ve zvláštních případech však nemusí být radioizotopové značení nezbytně nutné. Doporučuje se radioizotopové značení ^{14}C, ale použití jiných izotopů jako ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H může být také vhodné. Pokud je to možné, mělo by se značení nacházet v nejstabilnější části molekuly. Pokud například zkoušená látka obsahuje jedno jádro, vyžaduje se značení na tomto řetězci. Jestliže zkoušená látka obsahuje dvě nebo více jader, bude potřeba provést oddělené studie pro zhodnocení rozpadu každého značeného jádra a získání odpovídajících informací o vzniku produktů hydrolýzy. Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před prováděním hydrolytických zkoušek by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

a) rozpustnost ve vodě (zkušební metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (zkušební metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;

d) rozdělovací koeficient oktanol/voda (zkušební metoda A.8);

e) disociační konstanta (pK_a) (pokyny OECD 112) (9);

f) rychlost případné přímé a nepřímé fototransformace ve vodě.

Měly by být k dispozici analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolýzy ve vodných roztocích (viz také oddíl 1.7.2).

1.6. REFERENČNÍ LÁTKY

Kde je to možné, měly by být pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolýzy pomocí spektroskopické a chromatografické metody nebo jiné dostatečně citlivé metody použity referenční látky.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžek metody**

Analýza alespoň dvou pufračních roztoků nebo jejich extraktů okamžitě po přidání zkoušené látky poskytuje první údaje o opakovatelnosti analytické metody a o shodnosti postupu použití zkoušené látky. Výtěžky v posledních fázích pokusů závisí na příslušných hmotnostních bilancích (při použití radioizotopově značené látky). Výtěžky by se měly pohybovat od 90 % do 110 % u radioizotopově značených a radioizotopově neznačených chemikálií (7). V případě, že je technicky obtížné dosáhnout tohoto rozpětí, je pro radioizotopově neznačené chemikálie přípustný výtěžek 70 %. V tomto případě však musí být poskytnuto zdůvodnění.

▼B

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody použité pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a produktů hydrolýzy v pozdějších stadiích lze zkontrolovat dvojí analýzou stejných pufračních roztoků (nebo jejich extraktů) poté, co vznikne dostatečné množství produktů hydrolýzy pro jejich kvantitativní stanovení.

Analytická metoda by měla být dostatečně citlivá na to, aby bylo možno kvantitativně stanovit zkoušenou látku v koncentraci až do 10 % počáteční koncentrace nebo nižší. Je-li to potřeba, měly by být analytické metody také dostatečně citlivé, aby bylo možno kvantitativně stanovit všechny produkty hydrolýzy představující 10 % nebo více aplikované zkoušené látky (a to aplikované kdykoli během studie) a 25 % nebo méně její maximální koncentrace.

1.7.3. **Intervaly spolehlivosti hydrolytických kinetických dat**

Intervaly spolehlivosti by měly být vypočítány a uvedeny pro všechny regresní koeficienty, rychlostní konstanty, poločasy a další kinetické parametry (např. DT50).

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1. **Přístroje a pomůcky**

Studie by se měla provádět ve skleněných nádobách (např. zkumavky, malé baňky) v temnu a ve sterilních podmínkách, pokud ovšem předběžná informace (jako rozdělovací koeficient oktanol/voda) nenaznačuje, že by zkoušená látka mohla lnout ke sklu. V těchto případech je potřeba zvážit alternativní materiály (jako teflon). Problém lnutí ke sklu by mohlo také být možné zmírnit použitím jedné nebo více z následujících metod:

— stanovení hmotnosti zkoušené látky a produktů hydrolýzy sorbovaných ke zkušební nádobě,

— použití ultrazvukové lázně,

— zajištění omytí skla rozpouštědlem mezi každým intervalem odběru vzorku,

— použití upravených přípravků,

— použití zvýšeného množství kosolventu pro přidávání zkoušené látky do systému; v případě použití kosolventu by se měl použít kosolvent, který nezpůsobuje hydrolýzu zkoušené látky.

Pro inkubaci různých zkušebních roztoků je obvykle potřeba použít třepací vodní lázně s regulací teploty nebo inkubátory s termostatickou regulací.

Vyžaduje se standardní laboratorní vybavení, zejména:

— pH-metr,

▼B

— analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu radioizotopově značených a neznačených látek nebo inverzní zřeďovací metodu pro izotopy,

— přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),

— tekutý scintilační počítač,

— dělicí nálevky na extrakci kapalina-kapalina,

— přístroje pro zvyšování koncentrace roztoků a extraktů (např. rotační odpařovací zařízení),

— zařízení pro regulaci teploty (např. vodní lázeň).

Chemická činidla zahrnují například:

— organická rozpouštědla, činidla analytické kvality jako hexan, dichlormetan atd.,

— scintilační kapalinu,

— pufrační roztoky (podrobnosti viz v oddíle 1.8.3).

Veškeré sklo, voda čistoty p.a. a pufrační roztoky používané v hydrolytických zkouškách by měly být sterilizované.

1.8.2. **Aplikace zkoušené látky**

Zkoušená látka by se měla aplikovat jako vodný roztok do různých pufračních roztoků (viz dodatek 3). Je-li to nutné pro dosažení řádného rozpuštění, je dovoleno pro aplikaci a distribuci zkoušené látky použít malé množství rozpouštědel mísitelných s vodou (jako acetonitril, aceton, etanol), neměly by však překročit 1 % obj. Uvažuje-li se o vyšší koncentraci rozpouštědel (např. v případě málo rozpustných zkoušených látek), je to možné pouze tehdy, lze-li dokázat, že rozpouštědlo nemá žádný vliv na hydrolýzu zkoušené látky.

Použití upraveného přípravku se běžně nedoporučuje, protože nelze vyloučit, že by složky formulace neměly vliv na hydrolytický proces. U zkoušených látek špatně rozpustných ve vodě nebo u látek, které lnou ke sklu (viz oddíl 1.8.1), však může být použití upraveného materiálu vhodnou alternativou.

Použít by se měla jen jedna koncentrace zkoušené látky. Neměla by překročit 0,01 M nebo polovinu koncentrace nasyceného roztoku (viz dodatek 1).

▼B

1.8.3. **Pufrační roztoky**

Hydrolytická zkouška by se měla provádět při hodnotách pH 4, 7 a 9. K tomuto účelu se za použití chemikálií a vody čistoty p.a. připraví pufrační roztoky. Některé vhodné pufrační roztoky jsou uvedeny v příloze 3. Je třeba poznamenat, že použitý pufrační roztok může mít vliv na rychlost hydrolýzy. Je-li tomu tak, je třeba zvolit jiný pufrační roztok ([1]).

Hodnota pH každého pufračního roztoku by se měla ověřit kalibrovaným pH-metrem s přesností alespoň 0,1 při požadované teplotě.

1.8.4. **Zkušební podmínky**

1.8.4.1. *Zkušební teplota*

Hydrolytické pokusy by se měly provádět za konstantních teplot. Pro účely extrapolace je důležité udržovat teplotu alespoň na ± 0,5°C.

Není-li hydrolytické chování zkoušené látky známé, měla by se předběžná zkouška (stupeň 1) provést při teplotě 50 °C. Pokud zkouška stupně 1 neprokáže, že je zkoušená látka stálá vůči hydrolýze, měly by se kinetické zkoušky vyšších stupňů provést minimálně při třech různých teplotách (včetně zkoušky při 50 °C). Doporučovaný rozsah teplot je 10–70 °C (nejlépe s alespoň jednou teplotou pod 25 °C), což bude zahrnovat vykazovanou teplotu 25 °C a většinu teplot vyskytujících se v poli.

1.8.4.2. *Světlo a kyslík*

Všechny hydrolytické zkoušky by měly být provedeny s využitím vhodné metody, která umožní zabránit fotolytickým vlivům. Měla by se přijmout veškerá vhodná opatření proti vlivu kyslíku (např. pětiminutovým probubláváním roztoku heliem, dusíkem nebo argonem před přípravou roztoku).

1.8.4.3. *Trvání zkoušky*

Předběžná zkouška by se měla provádět 5 dní, zatímco zkoušky vyššího stupně by se měly provádět až do 90 % hydrolýzy zkoušené látky nebo po dobu 30 dní podle toho, co nastane dříve.

1.8.5. **Provedení zkoušky**

1.8.5.1. *Předběžná zkouška (stupeň 1)*

Předběžná zkouška se provede při teplotě 50 ± 0,5°C a při hodnotách pH 4,0; 7,0 a 9,0. Pokud se po 5 dnech pozoruje stupeň hydrolýzy nižší než 10 % ($t_{0.525\ °C}$ > 1 rok), považuje se zkoušená látka za hydrolyticky stálou a obvykle nejsou žádné zkoušky potřeba. Je-li o látce známo, že je za teplot běžných v životním prostředí ([2]) nestálá, není předběžná zkouška nutná. Analytická metoda musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

([1]) Mabey a Mill doporučují použít namísto fosforečnanových pufračních roztoků boritanové a acetátové pufrační roztoky (11).

([2]) Tato informace může pocházet z jiných zdrojů, jako jsou hydrolytické údaje o strukturně podobných směsích z literatury, nebo z jiných předběžných, semikvantitativních hydrolytických zkoušek se zkoušenou látkou v ranější fázi vývoje.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolýzy nestabilních látek (stupeň 2)*

Zkoušky vyššího stupně by se měly provádět při hodnotách pH, při kterých bylo na základě předběžné zkoušky zjištěno, že je zkoušená látka nestálá. Pufrační roztoky zkoušených látek by se měly přechovávat v termostatech při zvolených teplotách. Pro zkoušku reakce prvního řádu by se měl každý reakční roztok analyzovat v časových intervalech, které dávají minimálně šest bodů obvykle mezi 10 % a 90 % hydrolýzy zkoušené látky. Měly by se odebrat jednotlivé paralelní zkušební vzorky (minimálně dva vzorky obsažené v oddělených reakčních nádobách) a jejich obsah by se měl při každém z minimálně šesti odběrů vzorků analyzovat (pro získání minimálně dvanácti paralelních bodů). Použití jednoho souhrnného vzorku, ze kterého se odeberou jednotlivé podíly zkoušeného roztoku v každém intervalu odběru vzorku, se považuje za nevhodné, protože tento způsob neumožňuje analýzu proměnnosti dat a může vést k problémům s kontaminací zkušebního roztoku. Na konci zkoušky vyššího stupně (tj. buď při dosažení 90 % hydrolýzy nebo po 30 dnech) by se měly provést zkoušky potvrzení sterility. Pokud však není pozorován žádný rozklad (tj. přeměna), nepovažují se zkoušky sterility za nutné.

1.8.5.3. *Určení produktů hydrolýzy (stupeň 3)*

Všechny důležité produkty hydrolýzy, alespoň ty, které představují více než 10 % aplikované dávky, by se měly identifikovat pomocí příslušných analytických metod.

1.8.5.4. *Nepovinné zkoušky*

U hydrolyticky nestálých zkoušených látek se mohou požadovat další zkoušky při jiných hodnotách pH než 4, 7 a 9. Například pro fyziologické účely lze požadovat zkoušku provedenou za kyselejších podmínek (např. pH 1,2) s využitím jediné fyziologicky významné teploty (37 °C).

2. **ÚDAJE**

Množství zkoušené látky a případně produktů hydrolýzy by mělo být vyjádřeno jako % počáteční aplikované koncentrace a tam, kde to je vhodné, jako množství vyjádřené v mg/l pro každý interval odběru vzorku a každou hodnotu pH a zkušební teplotu. Kromě toho v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky by měla být hmotnostní bilance vyjádřena jako procento aplikované počáteční koncentrace.

Ve zprávě by mělo být uvedeno grafické znázornění logaritmicky převedených údajů o koncentracích zkoušené látky v závislosti na čase. Určeny by měly být všechny důležité produkty hydrolýzy, alespoň ty, které představují 10 % anebo více, a stejným způsobem jako u původní látky by měly být zakresleny také jejich logaritmicky převedené koncentrace, aby byla zřejmá rychlost tvorby a rozkladu těchto produktů hydrolýzy.

▼B

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Použitím vhodných výpočtů podle kinetických modelů by mělo být možno přesněji stanovit poločasy nebo hodnoty DT_{50}. Pro každé pH a teplotu by měly být vykázány hodnoty poločasu a/nebo DT_{50} (včetně intervalů spolehlivosti), a to společně s popisem použitého modelu, řádem kinetiky a koeficientem určení (r^2). Je-li to vhodné, měly by být výpočty použity také na produkty hydrolýzy.

V případě studia rychlosti provedeného při různých teplotách by měly být rychlostní konstanty hydrolytických reakcí pseudoprvního řádu ($k_{pozorov}$) popsány jako funkce teploty. Výpočet by měl vycházet jak z rozdělení $k_{pozorov}$ do rychlostních konstant pro hydrolýzu s kyselým katalyzátorem, neutrální hydrolýzu a hydrolýzu se zásaditým katalyzátorem (k_H, $k_{neutral}$ a k_{OH}) tak z Arrheniovy rovnice:

$$k_{pozorov} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i jsou regresní konstanty z úseku a směrnice nejlépe proložených křivek získaných lineární regresí ln k_i proti převrácené hodnotě absolutní teploty v kelvinech (T). Pomocí využití Arrheniovy rovnice pro kyselé, neutrální a zásadité hydrolýzy lze vypočítat rychlostní konstanty reakcí pseudoprvního řádu, a tudíž poločasy pro ostatní teploty, pro které nelze stanovit rychlostní konstantu přímým experimentálním stanovením (10).

2.2. VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Většina hydrolytických reakcí sleduje zřejmé rychlosti reakcí prvního řádu, proto jsou poločasy nezávislé na koncentraci (viz rovnici 4 v příloze 2). To obvykle umožňuje použití laboratorních výsledků stanovených při látkovém množství 10^{-2} až 10^{-3} M na podmínky životního prostředí ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey a Mill (11) publikovali několik příkladů dobré shody mezi rychlostmi hydrolýzy naměřenými v čisté vodě i v přírodních vodách u různých chemikálií za předpokladu, že byly měřeny jak pH, tak teplota.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (uvádějící místo značení v případě použití radioizotopově značeného materiálu) a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),

— čistota (znečištění) zkoušené látky,

— izotopová čistota radioizotopově značené chemikálie a molární aktivita (kde to je možné).

▼B

— Pufrační roztoky:

— data přípravy a podrobnosti o přípravě,

— použité pufry a vody,

— molarita a pH pufračních roztoků.

Zkušební podmínky:

— data provedení studií,

— množství aplikované zkoušené látky,

— metoda a rozpouštědla (druh a množství) použitá pro aplikaci zkoušené látky,

— objem inkubovaných pufračních roztoků zkoušené látky,

— objem inkubovaných pufračních roztoků zkoušené látky,

— pH a teplota během studie,

— časy odběrů vzorků,

— metody extrakce,

— metody pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a produktů její hydrolýzy v pufračních roztocích,

— počet paralelních vzorků.

Výsledky:

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— výtěžky (procentuální hodnoty pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— paralelní údaje a prostředky ve formě tabulky,

— hmotnostní bilance během studií a na jejich konci (v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky),

— výsledky předběžné zkoušky,

— rozbor a interpretace výsledků,

— všechny původní údaje a čísla.

Následující informace jsou potřeba, pouze je-li stanovena rychlost hydrolýzy:

— grafy závislosti koncentrací na čase pro zkoušenou látku a popřípadě produkt hydrolýzy při každé hodnotě pH a teplotě,

— tabulky výsledků Arrheniovy rovnice pro teploty 20 °C/25 °C, s hodnotami pH, rychlostní konstantou (h^{-1} nebo den^{-1}), poločasem nebo DT_{50}, teplotami (°C) včetně intervalů spolehlivosti a korelačních koeficientů (r^2) nebo srovnatelných informací,

— navrhovaný způsob hydrolýzy.

▼B

4. **LITERATURA**

1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

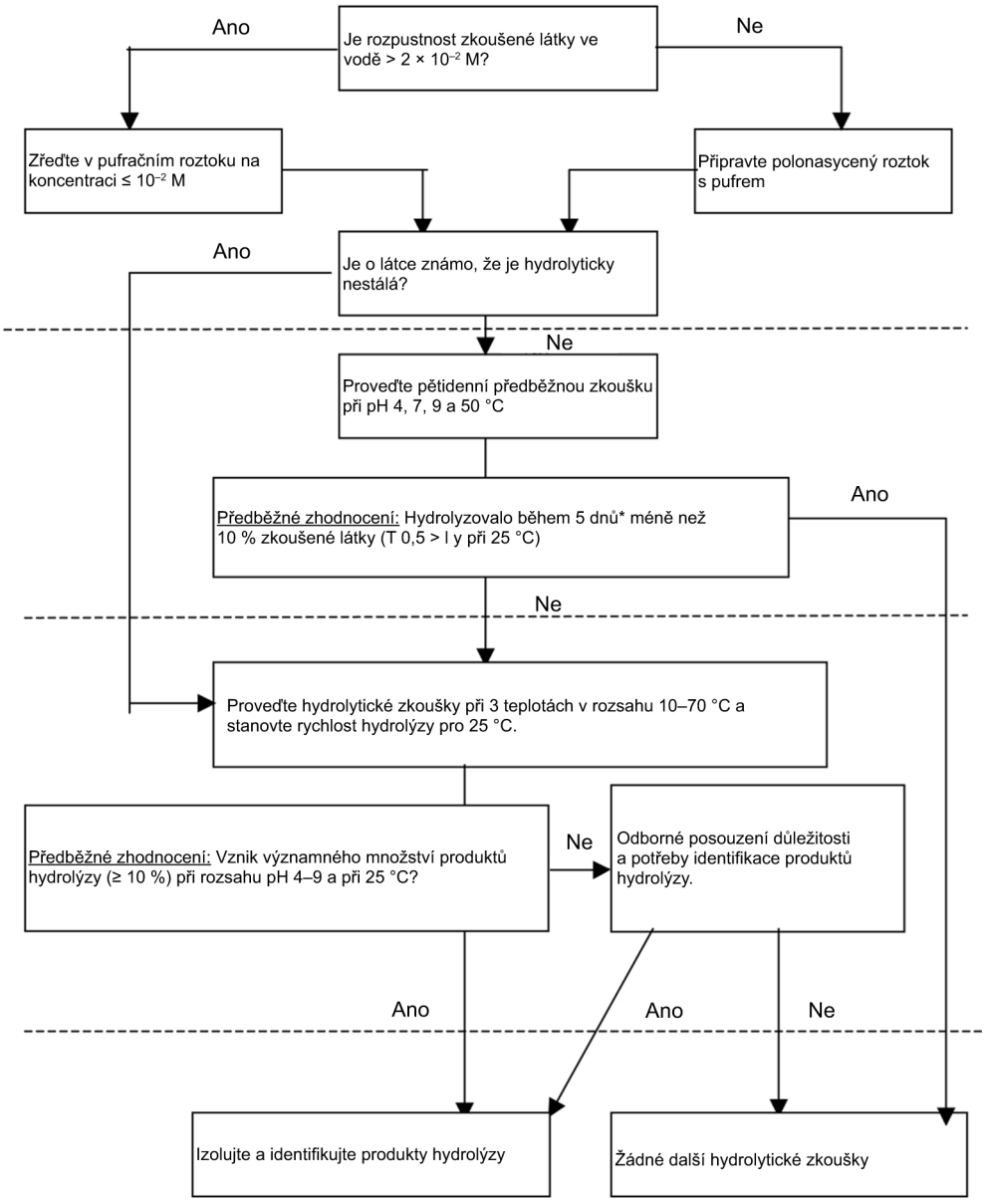
10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-41

▼B

DODATEK 1

Schéma stupňovité hydrolytické zkoušky



* 10% hydrolýza zkoušené látky při teplotě 50 °C odpovídá poločasu přibližně 30 dní, což odpovídá přibližné délce 1 roku při 25 °C.

▼B

DODATEK 2

Definice a jednotky

V každém případě by se měly používat **standardní mezinárodní jednotky (SI).**

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať už původní látka, nebo příslušné produkty přeměny.

Produkty přeměny: veškeré látky vzniklé reakcemi biotické nebo abiotické přeměny zkoušené látky.

Produkty hydrolýzy: veškeré látky vzniklé reakcemi hydrolytické přeměny zkoušené látky.

Hydrolýza je reakce zkoušené látky RX s vodou s prostou výměnou skupiny X za skupinu OH v reakčním centru:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Rychlost, kterou klesá koncentrace látky RX v tomto zjednodušeném procesu, je dána vztahem:

rychlost = k $[H_2O]$ [RX] reakce druhého řádu

nebo

rychlost = k [RX] reakce prvního řádu

v závislosti na kroku určujícím rychlost. Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce ve velkém přebytku, označuje se obvykle tento typ reakce jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je pozorovaná rychlostní konstanta dána vztahem

$$k_{pozorov.} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

a lze ji určit z výrazu (*)

$$k_{pozorov.} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kde:

kde t = čas

a C_o, C_t = koncentrace látky RX v časech 0 a t.

Jednotky této konstanty mají rozměr $(\text{čas})^{-1}$ a poločas reakce (čas pro zreagování 50 % látky RX) je dán vztahem

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{pozorov.}} \qquad [4]$$

Poločas: ($t_{0,5}$) je čas pro dosažení 50 % hydrolýzy zkoušené látky, kdy lze reakci popsat pomocí kinetiky prvního řádu; je závislý na koncentraci.

(*) Jestliže vynesení logaritmicky převedených údajů proti času nemá lineární funkci (rovnající se rychlosti reakce prvního řádu), potom není použití rovnice [3] vhodné pro stanovení rychlostní konstanty hydrolýzy zkoušené látky.

▼B

DT_{50} (čas úbytku 50): je čas, během kterého dojde k 50 % snížení koncentrace zkoušené látky; liší se od poločasu $t_{0,5}$, kdy reakce nesleduje kinetiku prvního stupně.

Odhad k při odlišné teplotě

Jsou-li rychlostní konstanty známy pro dvě teploty, lze vypočítat rychlostní konstantu při jiných teplotách pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ nebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Vynesením ln k proti 1/T do grafu vzniká rovná čára se směrnicí – E/R

kde:

k = rychlostní konstanta naměřená při různých teplotách

E = aktivační energie [kJ/mol]

T = absolutní teplota [K]

R = plynová konstanta [8,314 J/mol.K]

Aktivační energie byla vypočtena pomocí regresní analýzy nebo následující rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATEK 3

Pufrační roztoky

A. **CLARK A LUBS:**

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (*)

Složení	pH
0,2 N HC1 A 0,2 N KC1 PŘI 20ºC	
47,5 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	2,2
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N HC1 při 20ºC	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N NaOH při 20 ºC	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v těchto tabulkách byly vypočteny na základě potenciálních měření pomocí Sörensenových standardních rovnic (1909). Odpovídající hodnoty pH jsou o 0,04 jednotek vyšší než hodnoty uvedené v tabulkách.

▼B

Složení	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	6,0

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (pokračování)

0,1 M dihydrogenfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH při 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 v 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH při 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**

Citrátové pufry KOLTHOFFA a VLEESCHHOUWERA

Složení	pH
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N HC1 při 18°C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,6
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N NaOH při 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	6,0

(*) Přidejte malý krystalek thymolu nebo podobné látky pro zabránění vzniku plísní.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

SÖRENSENOVY boritanové směsi

Složení		Sörensen 18 °C	Walbum, pH při		
ml boraxu	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraxu + 0,1 N HC1					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraxu + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

SÖRENSENOVY fosfátové směsi

Složení	pH
0,0667M dihydrogenfosforečnanu draselného + 0,0667 M hydrogenfosforečnanu disodného při 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. TOXICITA PRO ŽÍŽALY

ZKOUŠKA NA UMĚLÉ PŮDĚ

1. METODA

1.1. ÚVOD

V této laboratorní zkoušce se zkoušená látka přidá do umělé půdy, do které se na 14 dní umístí žížaly. Po této době (a popřípadě po sedmi dnech) se vyšetří letální účinek látky na žížaly. Zkouška je metodou pro relativně krátkodobý orientační screening účinku chemických látek na žížaly při dermálním a dietárním příjmu.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

LC_{50}: Koncentrace látky, u níž lze očekávat, že způsobí během zkoušky uhynutí 50 % testovacích zvířat.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKA

Referenční látka se použije k pravidelnému ověřování toho, že se citlivost zkušebního systému podstatně nezměnila.

Jako referenční látka se doporučuje chloracetamid analytické čistoty.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Půda je proměnlivé prostředí, takže se pro tuto zkoušku používá pečlivě definovaná umělá hlinitá půda. V definované umělé půdě se chovají dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámka v příloze) a exponují se různým koncentracím zkoušené látky. Obsah nádob se po 14 dnech (a popřípadě i po sedmi dnech) po začátku zkoušky rozprostře na podložku a spočítají se žížaly, které při jednotlivých koncentracích přežily.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Zkouška je navržena tak, aby byla z hlediska zkušebního substrátu a organismů co nejreprodukovatelnější. Úhyn v kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %, jinak je zkouška neplatná.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. *Materials*

1.6.1.1. Zkušební substrát

Jako základní substrát pro zkoušku se používá definovaná umělá půda.

a) Základní substrát (procenta jsou vztažena k hmotnosti sušiny):

— 10 % sfagnové rašeliny (o pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mleté),

▼B

— 20 % kaolinitického jílu, pokud možno s více než 50 % kaolinitu,

— asi 69 % průmyslového křemenného písku (převažuje jemný písek s více než 50 % částic velikosti 0,05 až 0,2 mm). Pokud zkoušená látka není dostatečně dispergovatelná ve vodě, je třeba ponechat k dispozici pro pozdější míšení se zkoušenou látkou 10 g na každou zkušební nádobu,

— asi 1 % práškového chemicky čistého uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$), přidaného pro úpravu pH na pH 6,0 ± 0,5.

b) Zkušební substrát:

Zkušební substrát obsahuje základní substrát, zkoušenou látku a deionizovanou vodu.

Obsah vody činí asi 25 až 42 % suché hmotnosti základního substrátu. Obsah vody v substrátu se stanoví vysušením vzorku do konstantní hmotnosti při 105 °C. Klíčovým kritériem je, aby byla umělá půda zvlhčena tak, aby neobsahovala stojící vodu. Mísení musí být prováděno pečlivě, aby bylo dosaženo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. Způsob vpravení zkoušené látky do substrátu je třeba uvést ve zprávě. The way of introducing the test substance to the substrate has to be reported.

c) Kontrolní substrát:

Kontrolní substrát obsahuje základní substrát a vodu. Přidává-li se přísada, musí další kontrola obsahovat stejné množství přísady

1.6.1.2. Zkušební nádoby

Skleněné nádoby asi na jeden litr (řádně přikryté víky z plastu, miskami nebo fólií z plastu s větracími otvory) naplněné takovým množstvím vlhkého zkušebního nebo kontrolního substrátu, které odpovídá 500 g suchého substrátu.

1.6.2. *Zkušební podmínky*

Nádoby se uchovávají v klimatizovaných komorách při teplotě 20 ± 2 °C se stálým světlem. Intenzita světla by měla být 400 až 800 lx.

Doba trvání zkoušky je 14 dní, avšak úhyn lze popřípadě vyhodnotit po sedmi dnech od začátku zkoušky.

1.6.3. *Zkušební postup*

Zkoušené koncentrace

Koncentrace zkoušené látky se vyjádří v hmotnosti látky vztažené na jednotku suché hmotnosti základního substrátu (mg/kg).

Orientační zkouška

Rozsah koncentrací, které způsobují úhyn od 0 do 100 %, lze stanovit v orientační zkoušce, která poskytne informace o vhodném rozmezí koncentrací pro hlavní zkoušku.

▼B

Látka se zkouší při těchto koncentracích: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

Je-li třeba provést úplnou hlavní zkoušku, stačí pro orientační zkoušku jedna zkušební skupina o 10 žížalách na každou koncentraci a jedna pro neexponovanou kontrolu.

Hlavní zkouška

Výsledky orientační zkoušky se použijí pro volbu nejméně pěti koncentrací tvořících geometrickou řadu, lišících se faktorem nepřekračujícím 1,8 a přesně pokrývajících rozsah 0 až 100 % mortality.

Zkoušky s těmito řadami koncentrací by měly umožnit co nejpřesnější odhad hodnoty LC_{50} a jejího intervalu spolehlivosti.

V hlavní zkoušce se použijí nejméně čtyři zkušební skupiny na každou koncentraci a čtyři neexponované kontrolní skupiny, každá o 10 žížalách. Jako výsledek pro tyto replikované skupiny se uvede průměr a standardní směrodatná odchylka.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50}.

Mísení základního zkušebního substrátu a zkoušené látky

Zkušební substrát musí být pokud možno připraven bez jakýchkoli jiných přísad, než je voda. Těsně před začátkem zkoušky se emulze nebo disperse zkoušené látky v deionizované vodě nebo v jiném rozpouštědle smísí se základním zkušebním substrátem nebo se na něj rovnoměrné rozstříká jemným rozprašovačem pro chromatografii nebo podobným rozprašovačem.

Je-li zkoušená látka nerozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu).

K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Zkušební substrát musí být před použitím odvětrán. Množství odpařené vody musí být nahrazeno. Kontroly musí obsahovat stejné množství všech přísad.

Není-li zkoušená látka rozpustná, dispergovatelná ani emulgovatelná v organických rozpouštědlech, připraví se směs 10 g křemenného písku a takového množství zkoušené látky, které je potřebné pro zapracování do 500 g zkušebního substrátu (suchá hmotnost), a ta se smísí s 490 g základního substrátu (suchá hmotnost).

Pro každou zkušební skupinu se do skleněné nádoby vpraví množství vlhkého zkušebního substrátu, která odpovídá 500 g suchého substrátu, a na povrch substrátu se umístí 10 žížal, které byly před použitím 24 hodin aklimatizovány v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaveny přebytečné vody osušením na filtračním papíru.

▼B

Nádoby se přikryjí víky z plastu s otvory, miskami nebo fólií, aby se zabránilo vysychání substrátu, a udržují se ve zkušebních podmínkách 14 dní.

Vyhodnocení se provede 14 dní (popřípadě i sedm dní) po zahájení zkoušky. Substrát se rozprostře na podnos ze skla nebo korozivzdorné oceli. Žížaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žížaly se považují za mrtvé, jestliže nereagují na jemné mechanické podráždění na předním konci.

Provádí-li se vyšetření po sedmi dnech, nádoba se opět naplní substrátem a přežívající žížaly se opět vloží na povrch téhož zkušebního substrátu.

1.6.4. *Zkušební organismy*

Ve zkoušce se použijí dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámku v doplňku) (alespoň dva měsíce staré s klitellem) o hmotnosti (ve vlhkém stavu) 300 až 600 mg. (Metody množení viz doplněk.)

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se koncentrace zkoušené látky a odpovídající podíl mrtvých žížal v procentech.

Jsou-li údaje dostačující, stanoví se standardními metodami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, nebo rovnocenná metoda) hodnota LC_{50} a interval spolehlivosti ($p = 0,05$). LC_{50} se udává v mg zkoušené látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

V případech, kdy je sklon koncentrační křivky pro výpočet LC_{50}, příliš strmý, stačí grafický odhad této hodnoty.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50}.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— prohlášení, že zkouška byla provedena v souladu s výše uvedenými kritérii jakosti,

— provedené zkoušky (orientační zkouška a/nebo hlavní zkouška),

— přesný popis zkušebních podmínek nebo prohlášení, že zkouška byla provedena podle této metody; musí být uvedeny všechny odchylky,

— přesný popis způsobu smísení zkoušené látky se základním substrátem,

— informace o zkušebních organismech (druhy, stáří, průměrná hmotnost a rozpětí hmotnosti, podmínky množení, původ),

▼B

— metoda použitá pro stanovení LC_{50},

— výsledky zkoušky včetně všech použitých údajů,

— popis pozorovaných symptomů nebo změn v chování zkušebních organismů,

— úhyn v kontrolách,

— hodnota LC_{50} nebo nejvyšší zkoušená koncentrace nevyvolávající úhyn a nejnižší zkoušená koncentrace vyvolávající 100 % úhyn 14 dní (popřípadě i sedm dní) od začátku zkoušky,

— graf závislosti koncentrace/odezva,

— výsledky získané s referenční látkou, ať v souvislosti s touto zkouškou, nebo z dřívějších zkoušek kontroly jakosti.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, rozhodnutí Rady C(81)30 v konečném znění.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, london, str. 331.

3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, str. 99.

5) Komise Evropských společenství, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Doplněk

Množení a chov žížal před zkouškou

Pro účely množení se 30 až 50 dospělých žížal umístí do chovné schránky s čerstvým substrátem a vyjmou se po 14 dnech. Tyto jedince je možné použít pro další chovné vsázky. Žížaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (v uvedených podmínkách po dvou až třech měsících).

Podmínky chovu a množení

Klimatizovaná komora:	teplota 20 ± 2 °C, nejlépe s nepřetržitým osvětlením (intenzita 400–800 lx).
Chovné nádoby:	vhodné mělké nádoby o objemu 10 až 20 l.
Substrát:	druh *Eisenia foetida* je možné chovat v různých zvířecích exkrementech. Jako chovné médium se doporučuje používat směs 50 % (obj.) rašeliny a 50 % (obj.) hovězího nebo koňského hnoje. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mmhos nebo s 0,5 % koncentrací solí).
	Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrý.
	Kromě výše uvedené metody je možné používat i jiné úspěšné postupy.

Poznámka: Druh *Eisenia foetida* existuje ve dvou formách, které někteří taxonomové rozlišili na druhy (Bouche, 1972). Jsou si morfologicky podobné, avšak jeden, *Eisenia foetida foetida*, má na článcích typické příčné pruhování nebo páskování a druhý, *Eisenia foetida andrei*, toto pruhování postrádá a je různě červeně zbarven. Pokud je to možné, použije se *Eisenia foetida andrei*. Jiné druhy je možné použít, pokud je k dispozici potřebná metodika.

▼B

C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

ZAHN-WELLENSOVA ZKOUŠKA

1. METODA

1.1. ÚVOD

Účelem metody je posoudit statickou zkouškou možnost úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsouli vystaveny účinku poměrně vysokých koncentrací mikroorganismů.

Může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných částicích; tato skutečnost musí být zohledněna při interpretaci výsledků (viz bod 3.2).

Zkoušené látky jsou používány v koncentracích odpovídajících hodnotám DOC od 50 do 400 mg/l nebo hodnotám CHSK od 100 do 1 000 mg/l (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku). Tyto poměrně vysoké koncentrace umožňují spolehlivou analýzu. Sloučeniny s toxickými vlastnostmi mohou však proces rozkladu zpomalit nebo zastavit.

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku nebo chemické spotřeby kyslíku.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látek (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

— jsou za zkušebních podmínek rozpustné ve vodě,

— mají za zkušebních podmínek zanedbatelný tlak par,

— neinhibují bakterie,

— jsou ve zkušebním systému pouze omezeně adsorbovány,

— pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

▼B

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Po ukončení zkoušky se míra rozkladu označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou ZahnWellensovou zkouškou“:

$$D_t = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kde:

D_t = rozklad (%) v čase t,

C_A = hodnoty DOC (nebo CHSK) zkušební směsi měřené tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l) (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku),

C_T = hodnoty DOC nebo CHSK zkušební směsi v době odběru vzorku (mg/l),

C_B = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu v době odběru vzorku (mg/l),

C_{BA} = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l).

Stupeň rozložitelnosti se zaokrouhlí na celá procenta.

Jako procentuální rozložitelnost se uvede procentuální snížení hodnot DOC (nebo CHSK) zkoušené látky.

Rozdíl mezi hodnotou naměřenou po třech hodinách a vypočítanou nebo přednostně naměřenou počáteční hodnotou poskytuje užitečnou informaci o rozložitelnosti zkoušené látky (viz bod 3.2 Interpretace výsledků).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal, minerální živné médium a zkoušená látka jako zdroj uhlíku ve vodném roztoku se smíchají ve skleněné nádobě na jeden až čtyři litry s míchadlem a provzdušňovacím zařízením. Suspense se míchá a provzdušňuje až 28 dní při teplotě 20–25 °C při rozptýleném světle nebo v temnu. Rozklad se sleduje denně nebo v jiných vhodně stanovených pravidelných časových intervalech prostřednictvím měření hodnot DOC (nebo CHSK) v odebraném vzorku po jeho filtraci. Procentuální hodnota biologického rozkladu v čase se vyjádří jako poměr hodnot DOC (nebo CHSK) v době odběru vzorku a hodnoty po třech hodinách od zahájení zkoušky a slouží jako míra rozkladu v daném čase. Výsledky se vynesou do grafu proti času a vytvoří křivku biologického rozkladu.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

▼B

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této zkoušky byla ověřena mezilaboratorními okružními testy.

Citlivost metody je značně závislá na variabilitě slepého vzorku, v menší míře na přesnosti stanovení množství rozpuštěného organického uhlíku a na koncentraci zkoušené látky v suspensi.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

1.6.1.1. Reakční činidla

Zkušební voda: pitná voda s obsahem organického uhlíku menším než 5 mg/l. Koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů nesmí překročit 2,7 mmol/l; v opačném případě je nutné jako rozpouštědlo použít deionizovanou nebo destilovanou vodu.

Kyselina sírová p.a	50 g/l
Hydroxid sodný p.a	40 g/l
Minerální živné médium: v jednom litru deionizované vody se rozpustí:	
Chlorid amonný NH_4Cl p.a.	38,5 g
Dihydrogenfosforečnan sodný, $NaH_2PO_4.2H_2O$ p.a.	33,4 g
Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 p.a.	8,5 g
Hydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 p.a.	21,75 g

Tento roztok slouží jako živný roztok a jako pufr pH.

1.6.1.2. Přístroje a pomůcky

Skleněné nádoby na jeden až čtyři litry (např. válcové nádoby).

Míchačka se skleněným nebo kovovým míchadlem na vhodné stopce (míchadlo by mělo být umístěno 5–10 cm nad dnem nádoby). Namísto toho lze použít magnetické míchadlo dlouhé 7–10 cm.

Skleněná provzdušňovací trubice o vnitřním průměru 2–4 mm. Vyústění trubice by mělo být umístěno asi 1 cm nad dnem nádoby.

Odstředivka (cca 3 550g).

pH-metr.

Oxymetr.

Papírové filtry.

▼B

Zařízení pro membránovou filtraci.

Membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm. Vhodné membránové filtry nesmí během filtrace uvolňovat ani absorbovat uhlík.

Analyzátor ke stanovení obsahu organického uhlíku a vybavení ke stanovení CHSK.

1.6.1.3. Příprava inokula

Aktivovaný kal z biologické čistírny se promyje zkušební vodou (viz výše), a to buď (opakovanou) centrifugací, nebo sedimentací.

Aktivovaný kal musí mít vhodné složení. Takový kal se vyskytuje v řádně fungujících čistírnách odpadních vod. Má-li být získáno co nejvíce různých druhů nebo kmenů bakterií, může být vhodné namíchat inokulum z různých zdrojů (např. z různých čistíren, z půdního extraktu, z říčních vod atd.). Směs se zpracuje výše uvedeným způsobem.

Kontrola aktivity aktivovaného kalu je popsána níže v bodu 1.6.2 v odstavci Funkční kontrola aktivovaného kalu.

1.6.1.4. Příprava zkušebních roztoků

Do zkušební nádoby se odměří 500 ml zkušební vody, 2,5 ml minerálního živného roztoku na litr a přidá se aktivovaný kal v množství odpovídajícím 0,2 až 1,0 g sušiny v litru konečné směsi. Přidá se takový objem základního roztoku zkoušené látky, aby byla dosaženo koncentrace rozpuštěného organického uhlíku 50 až 400 mg na litr suspense. Odpovídající hodnoty CHSK jsou 100 až 1 000 mg/l. Směs se doplní vodou do celkového objemu jeden až čtyři litry. Celkový zvolený objem je závislý na počtu odebíraných vzorků nutných ke stanovení hodnot DOC nebo CHSK a na tom, jaký objem budou mít odběry požadované pro analytický postup.

Zpravidla se za dostatečný objem považují dva litry. Současně se s každou zkušební sérií nasadí alespoň jeden kontrolní slepý vzorek; obsahuje pouze aktivovaný kal a minerální živné médium doplněné vodou na stejný objem jako zkoušená směs.

1.6.2. *Postup zkoušky*

Zkušební nádoby se promíchávají magnetickými míchadly nebo šroubovitými míchadly při rozptýleném světle nebo v temnu při teplotě 20–25 °C. Nádoba se provzdušňuje tlakovým vzduchem, který je podle potřeby čištěn vatovým filtrem a přes promývačku. Musí být zajištěno, aby nedošlo k usazení kalu a aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 2 mg/l.

V pravidelných intervalech (např. denně) se měří pH a podle potřeby se upraví na pH 7–8.

▼B

Ztráty vypařováním se před každým odběrem vzorku vyrovnají potřebným množstvím destilované nebo deionizované vody. Je účelné vyznačit na nádobě hladinu kapaliny před začátkem zkoušky. Nové vyznačení se provede vždy po odebrání vzorku (při vypnutém provzdušňování a míchaní). První vzorky se odebírají vždy tři hodiny po zahájení zkoušky s cílem zjistit míru adsorpce zkoušeného materiálu na aktivovaném kalu.

Rozklad zkoušené látky se sleduje stanovením hodnoty DOC a CHSK prováděným denně nebo v jiných pravidelných intervalech. Vzorky ze zkušební nádoby a ze slepého pokusu se zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr. Prvních 5 ml filtrátu se odstraní. Kaly, které se špatně filtrují, mohou být odděleny desetiminutovým odstřeďováním. Provádí se nejméně dvě souběžná stanovení DOC a CHSK. Směs se nechá inkubovat až 28 dní.

Poznámka: Vzorky, které zůstávají zakalené, se zfiltrují přes membránový filtr. Membránový filtr nesmí uvolňovat ani adsorbovat žádné organické látky.

Funkční kontrola aktivovaného kalu

Souběžně s každou sérií pokusů se nasadí nádoba se známou látkou, která slouží ke kontrole funkční kapacity aktivovaného kalu. Jako vhodná látka pro tento účel se ukázal diethylenglykol.

Adaptace

Jsou-li v poměrně krátkých časových intervalech (např. denně) prováděny analýzy, lze na křivce rozložitelnosti rozlišit adaptační fázi (viz obrázek 2). Proto by zkouška neměla být nasazována na konci pracovního týdne.

Jestliže k adaptaci dochází na konci normální délky zkoušky, může být zkouška prodloužena až do konečného rozložení zkoušené látky.

Poznámka: Je-li třeba důkladně poznat chování aktivovaného kalu, exponuje se tentýž aktivovaný kal ještě jednou zkoušené látce takto:

Míchadlo a provzdušňovací zařízení se vypnou, aby se mohl aktivovaný kal usadit. Supernatant se odlije, dekantovaný kal v nádobě se doplní vodou na objem dvou litrů, 15 minut se míchá a opět se nechá sedimentovat. Po dekantaci supernatantu se zkouška opakuje se sedimentovaným kalem a stejnou zkoušenou látkou postupem podle výše uvedených bodů 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal může být namísto usazováním oddělen centrifugací.

Adaptovaný kal může být smíchán s čerstvým aktivovaným kalem tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,2–1 g sušiny na litr suspense.

▼B

Příprava pro analýzu

Vzorky se obvykle zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr (k promývání se použije deionizovaná voda).

Vzorky, které zůstanou zakalené, se zfiltrují přes membránové filtry (0,45 μm).

Ve filtrátech vzorku (prvních 5 ml filtrátu se odstraní) se přístrojem pro měření TOC provedou dvě stanovení koncentrace rozpuštěného uhlíku (DOC). Nemůže-li být filtrát analyzován v den odběru vzorku, musí být do příštího dne uchován v ledničce. Delší skladování se nedoporučuje.

CHSK se ve filtrátu vzorku stanoví analytickým postupem pro stanovení CHSK popsaným níže v literatuře (2).

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Koncentrace DOC a/nebo CHSK se stanoví alespoň ve dvou duplikátních vzorcích postupem uvedeným výše v bodu 1.6.2. Rozklad v čase t se vypočte podle vzorce (s definicemi) uvedeného výše v bodu 1.2.

Hodnota stupně rozkladu se zaokrouhlí na celá procenta. Dosažená rozložitelnost na konci zkoušky se označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou Zahn-Wellensovou zkouškou“.

Poznámka: Je-li dosaženo úplného rozkladu zkoušené látky před řádným termínem ukončení zkoušky a výsledek je potvrzen druhý den další analýzou, může být zkouška ukončena.

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— počáteční koncentrace látky,

— všechny informace a experimentální výsledky týkající se zkoušené látky, popřípadě referenční látky a kontrolního vzorku,

— koncentrace látky po třech hodinách,

— křivka biologického rozkladu s popisem,

— datum a místo odběru zkušebních organismů, stav adaptace, použitá koncentrace atd.,

— vědecké odůvodnění všech změn ve zkušebního postupu.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Postupné ubývání DOC nebo snižování CHSK, ke kterému dochází během dnů až týdnů, naznačuje, že zkoušená látka je biologicky rozkládána.

▼B

V mnoha případech však může ovlivňovat výsledky zkoušky fyzikálně-chemická adsorpce; to lze prokázat tím, že se zjistí úplné nebo částečné ubývání DOC nebo snižování CHSK během prvních tří hodin zkoušky a že rozdíl mezi supernatantem ze slepého vzorku a ze zkoušeného vzorku je nečekaně malý.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky.

To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrií).

Zkoušené látky, které vykazují velký úbytek DOC nebo pokles CHSK, který není ovlivněn adsorpcí, lze pokládat za biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná. Nízký nebo nulový úbytek DOC nebo pokles CHSK může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím zkoušených látek značených 14C. Při použití zkoušené látky značené 14C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $14CO_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musí být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. LITERATURA

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) Příloha V směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19.9.1984, s. 1), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.

▼B

Doplněk

PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

Organická látka	4-ethoxybenzoová kyselina
Teoretická koncentrace ve zkoušce	600 mg/l
Teoretický DOC:	390 mg/l
Inokulum	čistírna odpadních vod v …
Koncentrace:	1 g sušiny na litr
Adaptace:	bez adaptace
Analýza:	stanovení DOC
Množství vzorku:	3 ml
Referenční látka:	diethylenglykoll
Toxicita zkoušené látky:	žádné toxické účinky při koncentraci menší než 1 000 mg/l Použitá zkouška: zkouška ve fermentačních trubicích

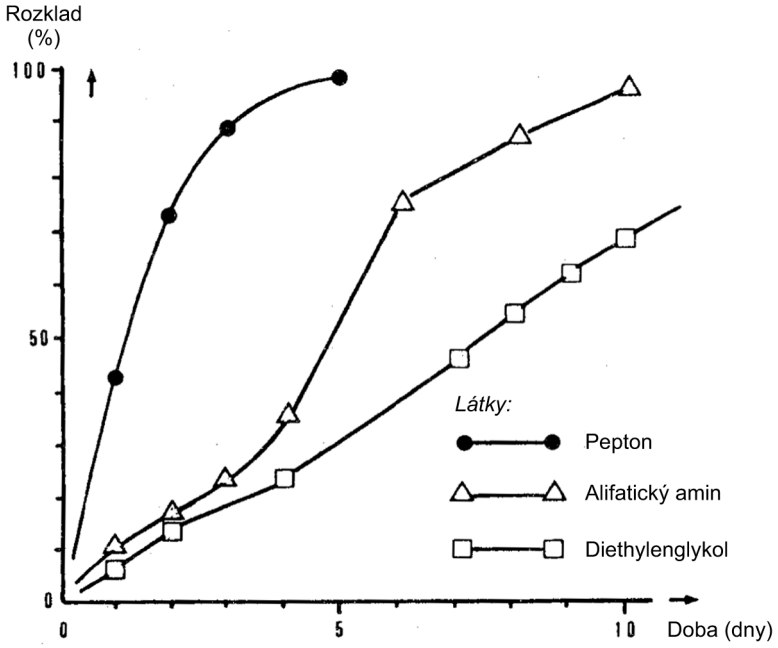
Čas v průběhu zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	Slepý vzorek DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %	DOC ([1]) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 den	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dny	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dnů	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dnů	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dnů	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dnů	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dnů	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dnů	18,0	37,0	19,0	94	20,2	2,0	99

([1]) Střední hodnota ze tří stanovení.

▼B

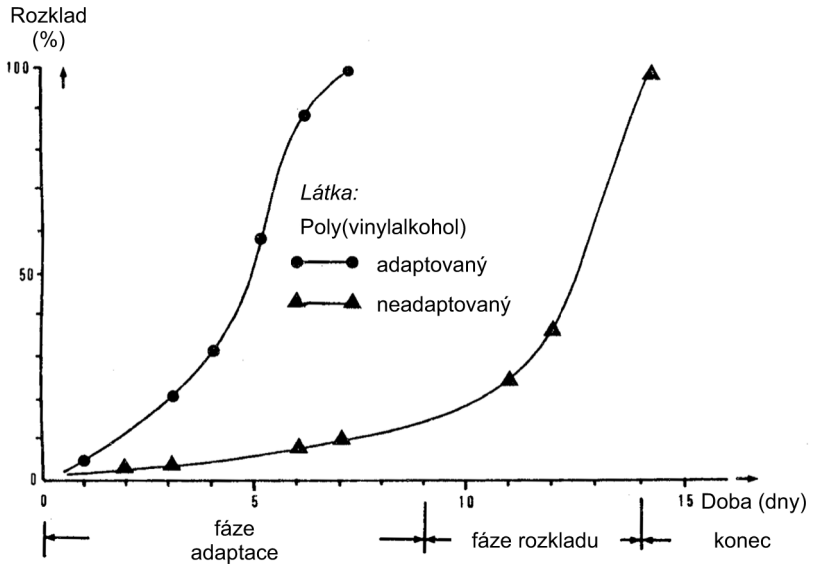
Obrázek 1

Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2

Příklady adaptace kalu



▼M4

C.10 SIMULAČNÍ ZKOUŠKA AEROBNÍHO ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD: C.10-A: JEDNOTKY AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY

C.10-A: Jednotky aktivovaného kalu

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 303 (2001). V 50. letech bylo zjištěno, že nově zavedené povrchově aktivní látky způsobují nadměrné pěnění v čistírnách odpadních vod a v řekách. Tyto látky nebyly zcela odstraněny při aerobním čištění a v některých případech omezovaly odstraňování jiných organických látek. Tato skutečnost byla důvodem celé řady šetření, jakým způsobem by bylo možno odstranit povrchově aktivní látky z odpadních vod a zda by byly nové chemické látky produkované průmyslem vhodné pro čištění odpadních vod. Za tímto účelem byly použity modelové jednotky reprezentující dva hlavní druhy aerobního biologického čištění odpadních vod (aktivovaný kal a biologická perkolační nebo skrápěná filtrace). Bylo by nepraktické a velmi nákladné distribuovat každou novou chemikálii a sledovat velké čistírny odpadních vod, a to i v místním měřítku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Jednotky aktivovaného kalu

2. Jsou popsány modelové jednotky aktivovaného kalu, jejichž velikost se pohybuje od 300 ml přibližně do 2 000 ml. Některé byly věrnou napodobeninou plnohodnotných čistíren, kde se usazovací nádrže s usazeným kalem přečerpávají zpět do aerační nádrže, zatímco jiné neměly žádná usazovací zařízení, např. Swisher (1). Velikost zařízení je kompromisem; na jedné straně musí být dostatečně velké, aby umožňovalo úspěšné provedení mechanických operací a zajišťovalo dostatečné množství vzorků, aniž by byl ovlivněn provoz, avšak na druhé straně by nemělo být tak velké, aby kladlo nadměrné nároky na prostor a materiál.

3. Rozsáhle a uspokojivě jsou využívány dva druhy zařízení – Husmannův model (2) a zařízení s porézní nádobou (3),(4), jichž bylo poprvé užito při studii povrchově aktivních látek; jejich popis je uveden v této zkušební metodě. S uspokojivým výsledkem byla použita i další zařízení, například Eckenfelderův model (5). Vzhledem k poměrně vysoké ceně a náročnosti použití této simulační zkoušky byly současně zkoumány jednodušší a levnější screeningové zkoušky, které jsou nyní začleněny do kapitoly C.4 A - F této přílohy (6). Zkušenosti s celou řadou povrchově aktivních látek a dalších chemických látek ukázaly, že chemické látky, které prošly screeningovými zkouškami (snadno biologicky rozložitelné látky) se rozložily i při simulační zkoušce. Některé chemické látky, které neprošly screeningovou zkouškou, prošly zkouškami vlastní biologické rozložitelnosti (kapitoly C.12 (7) a C.19 (8) této přílohy), ale pouze některé z této posledně jmenované skupiny se rozložily při simulační zkoušce, zatímco chemické látky, které neprošly zkouškou vlastní biologické rozložitelnosti, se nerozložily ani při simulačním zkoušce (9), (10), (11).

4. Pro některé účely jsou simulační zkoušky prováděné na základě jediného souboru pracovních podmínek dostatečné; výsledky jsou vyjádřeny procentem úbytku zkoušené chemické látky nebo rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Popis takové zkoušky je uveden v této zkušební metodě. Nicméně na rozdíl od předchozí verze této kapitoly, která popisovala pouze jeden typ zařízení čistícího syntetické odpadní vody ve spřaženém režimu pomocí poměrně hrubé metody odstraňování kalů, tento text uvádí

▼M4

celou řadu variant. Popisuje alternativy typu zařízení, způsobu provozu, likvidace odpadních vod a odstraňování kalu. Tento text se úzce drží textu normy ISO 11733 (12), který byl během jeho přípravy pečlivě zkoumán, přestože uvedená metoda nebyla podrobena mezilaboratorní porovnávací zkoušce.

5. Pro jiné účely je zapotřebí zjistit koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku a k tomu je nezbytné použít složitější metodu. Je například nezbytná přesnější kontrola rychlosti odtahu kalu v průběhu každého dne a po celou dobu zkoušky a zařízení je nutno provozovat při řadě různých rychlostí odtahů kalu. U plně komplexní metody by měly zkoušky probíhat rovněž při dvou nebo třech různých teplotách: tuto metodu popisuje Birch (13), (14) a je shrnuta v dodatku 6. Na základě současných znalostí však nelze rozhodnout, který z těchto kinetických modelů lze uplatnit na biologickou rozložitelnost chemických látek při čištění odpadních vod a ve vodném prostředí obecně. Použití kinetiky dle Monoda, které je uvedeno v dodatku 6 jako příklad, je omezeno na chemické látky přítomné v množství 1 mg/l a větším, ale podle některých názorů je i toto užití nutno odůvodnit. Zkoušky při koncentracích, které věrněji odrážejí koncentrace v odpadních vodách, jsou uvedeny v dodatku 7, ale tyto zkoušky a rovněž zkoušky v dodatku 6 jsou uvedeny v dodatcích, místo aby byly vydány jako samostatné zkušební metody.

Filtry

6. Mnohem menší pozornost byla věnována modelu biologických skrápěných filtrů, pravděpodobně proto, že jsou těžkopádnější a méně kompaktní než modelová zařízení s aktivovaným kalem. Gerike se spolupracovníky vyvinul zařízení pro skrápěnou filtraci a provozoval je ve spřaženém režimu (15). Tyto filtry byly poměrně velké (výška 2 m, objem 60 l) a každý z nich vyžadoval až 2 l/h odpadní vody. Baumann se spolupracovníky (16) simuloval skrápěné filtry vložením proužků polyesterového „rouna“ do trubek o délce 1 m (vnitřní průměr 14 mm) poté, co byly tyto proužky na dobu 30 minut ponořeny do koncentrovaného aktivovaného kalu. Zkoušená chemická látka jako jediný zdroj C v roztoku minerálních solí byla čerpána do svislé trubky a biologický rozklad byl posouzen na základě měření hodnot DOC v odtoku a CO_2 ve vzniklém plynu.

7. Biofiltry byly simulovány jiným způsobem (15), na vnitřní plochy rotačních trubek skloněné pod malým úhlem k vodorovné rovině se přiváděla odpadní voda (asi 250 ml/h) se zkoušenou látkou a bez ní a shromážděný odtok pak byl analyzován na přítomnost DOC a/nebo konkrétní zkoušené chemické látky.

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Touto metodou se stanoví odstranitelnost a primární a/nebo úplný biologický rozklad ve vodě rozpustných organických látek aerobními mikroorganismy v kontinuálně pracujícím testovacím systému simulujícím proces s aktivovaným kalem. Jedinými zdroji uhlíku a energie pro mikroorganismy jsou snadno rozložitelné organické médium a zkoušená organická látka.

9. Dva kontinuálně pracující modely (modely aktivace nebo modely s porézní nádobou) pracují paralelně za stejných podmínek zvolených tak, aby vyhovovaly účelu zkoušky. Průměrná hydraulická doba zdržení je obvykle 6 h a průměrné stáří kalu (doba zdržení kalu) se pohybuje od 6 do 10 dnů. Kal se odtahuje jednou ze dvou metod; zkoušená chemická látka se zpravidla přidává do přítoku (organického média) pouze jednoho z modelů v koncentraci odpovídající 10–20 mg/l rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Druhý model se provozuje jako kontrolní model pro stanovení biologické rozložitelnosti organického média.

▼M4

10. V pravidelných intervalech se odebírají vzorky odtoků, ve kterých se stanovuje v optimálním případě DOC, nebo chemická spotřeba kyslíku (CHSK) a rovněž koncentrace zkoušené chemické látky (je-li vyžadována) specifickou analýzou v odtoku z modelu, do něhož je vypouštěna zkoušená chemická látka. Předpokládá se, že rozdíl mezi koncentrací DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu pochází ze zkoušené chemické látky nebo jejích organických metabolitů. Tento rozdíl se porovná s koncentrací DOC nebo CHSK v přítoku pocházející ze zkoušené chemické látky, aby se určila její rozložitelnost.

11. Biologický rozklad lze zpravidla odlišit od bioadsorpce pečlivým prozkoumáním křivky odstranitelnosti v čase a obecně jej lze potvrdit pomocí zkoušky snadného biologického rozkladu pomocí aklimatizovaného inokula z modelu, do něhož je vypouštěna zkoušená chemická látka.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

12. Pro správnou interpretaci výsledků by měla být známa čistota zkoušené chemické látky, její rozpustnost ve vodě, těkavost a adsorpční vlastnosti. Těkavé a nerozpustné chemické látky lze zpravidla zkoušet jen tehdy, jsou-li přijata zvláštní opatření (viz dodatek 5). Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo pro ověření naměřených hodnot parametrů, např. teoretické spotřeby kyslíku (ThOD), rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a chemické spotřeby kyslíku (CHSK) je rovněž nutno znát chemickou strukturu nebo alespoň empirický vzorec.

13. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro mikroorganismy (viz dodatek 4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

14. Při původním uplatnění této simulační (potvrzující) zkoušky na primární biologický rozklad povrchově aktivních látek je vyžadováno odstranění více než 80 % určité chemické látky, aby mohla být povrchově aktivní látka uvedena na trh. Pokud není dosaženo hodnoty 80 %, lze použít tuto simulační (potvrzující) zkoušku a povrchově aktivní látku uvést na trh pouze za předpokladu odstranění více než 90 % dané chemické látky. Obecně se chemické látky neposuzují z hlediska vyhověla/nevyhověla a při přibližných výpočtech pravděpodobné koncentrace v životním prostředí, které se užívají při posuzování rizik plynoucích z chemických látek, lze použít získané hodnoty procenta úbytku. Výsledky mají tendenci sledovat vzorec tzv. „všechno nebo nic“. V řadě studií čistých chemických látek bylo zjištěno procento úbytku DOC > 90 % u více než tří čtvrtin a > 80 % u více než 90 % chemických látek, které nevykazují žádný významný stupeň biologické rozložitelnosti.

15. V odpadní vodě je přítomno relativně málo chemických látek (např. povrchově aktivních chemických látek) v koncentracích (asi 10 mg C/l) užitých při této zkoušce. Některé chemické látky mohou být v těchto koncentracích inhibující, zatímco kinetika úbytku jiných látek se může v nízkých koncentracích lišit. Přesnější stanovení rozkladu lze provést s využitím modifikovaných metod pomocí realisticky nízkých koncentrací zkoušené chemické látky a získané údaje by mohly být použity pro výpočet kinetických konstant. Potřebné experimentální techniky však dosud nejsou plně validovány a rovněž nebyly stanoveny modely kinetiky popisující reakce biologického rozkladu (viz dodatek 7).

▼M4

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

16. Aby bylo zajištěno správné provedení experimentálního postupu, je vhodné současně se zkoumáním zkoušených chemických látek provádět občasné zkoušky látek, jejichž chování je známé. Tyto chemické látky zahrnují kyselinu adipovou, 2-fenyl fenol, 1-naftol, kyselinu difenovou,1-kyselinu naftoovou apod. (9)(10)(11).

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

17. Existuje mnohem méně zpráv o studiích simulačních zkoušek než o zkouškách snadné biologické rozložitelnosti. Reprodukovatelnost mezi (simultánními) opakováními je dobrá (v rozmezí 10–15 %) u zkoušených látek rozložených z 80 % nebo více, ale u hůře rozložitelných chemických látek je variabilita větší. Také u některých hraničních chemických látek byly při různých příležitostech v průběhu 9 týdnů povolených v testu zaznamenány zcela rozdílné výsledky (např. 10 %, 90 %).

18. U výsledků získaných z uvedených dvou typů aparatur byly zaznamenány jen malé rozdíly, ale u některých chemických látek proběhl rozsáhlejší a konzistentnější rozklad za přítomnosti domovních odpadních vod než za přítomnosti syntetické odpadní vody dle OECD.

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Přístroje a pomůcky

Zkušební systém

19. Zkušební systém pro jednu zkoušenou chemickou látku se skládá ze zkušebního a kontrolního modelu; pokud se však provádějí pouze specifické analýzy (primární biologický rozklad), je vyžadován pouze zkušební model. Jeden kontrolní model může být použit pro více zkušebních zařízení, do nichž se vypouštějí buď stejné, nebo odlišné zkoušené chemické látky. V případě spřaženého zařízení (dodatek 3) se používá jeden kontrolní model pro každé zkušební zařízení. Zkušebním zařízením může být buď model aktivace, tj. Husmannův model (dodatek 1, obr. 1), nebo model s porézní nádobou (Dodatek 1, obr. 2). V obou případech se použijí zásobní nádoby s dostatečným objemem pro přítok a odtok a dávkovací čerpadla pro přítok, a to buď ve směsi s roztokem zkoušené chemické látky, nebo odděleně.

20. Každý model aktivace se skládá z aerační nádrže se známým objemem přibližně 3 litry aktivovaného kalu a sedimentační nádoby (sekundární dosazovací nádrže), s pracovním objemem přibližně 1,5 litru; objem lze do určité míry měnit nastavením výšky sedimentační nádoby. Jsou přípustné i nádoby s odlišnými objemy, pokud model pracuje s podobným hydraulickým zatížením. Pokud není možno udržet ve zkušební místnosti teplotu v požadovaném rozsahu, doporučuje se modely temperovat vodním pláštěm. Pro kontinuální nebo v pravidelných intervalech přerušovanou recirkulaci aktivovaného kalu z dosazovací nádrže do aerační nádrže se používá dávkovací čerpadlo nebo mamutka.

21. Model s porézní nádobou se skládá z vnitřního porézního válce s kuželovitým zakončením, který je vložen do poněkud větší nádoby stejného tvaru z nepropustného plastového materiálu. Jako materiál pro porézní nádobu může být použit porézní polyethylen s maximální velikostí pórů 90 μm a s tloušťkou 2 mm. K separaci kalu od upraveného organického média dochází filtrací porézní stěnou. Odtok se shromažďuje v prostoru mezi nádobami a odtéká do sběrné nádoby. Nedochází k sedimentaci, a proto aktivovaný kal nerecirkuluje. Celé zařízení může být umístěno v termostatované vodní lázni. Někdy dojde v počátečním stadiu k ucpání porézní nádoby a obsah přeteče. V takovém případě se ucpaný porézní válec

▼M4

nahradí novým, přičemž se kal z nádoby nejprve přelije do čisté nádoby a ucpaný válec se odstraní. Po otření nepropustného vnějšího válce se vloží čistý vnitřní válec a kal se vrátí do nádoby. Veškerý kal, který ulpí na stěnách ucpaného vnitřního válce, se rovněž pečlivě seškrábe a přenese. Ucpané válce se čistí nejprve pomocí tenkého proudu vody pro odstranění zbývajícího kalu a poté ponořením do zředěného roztoku chlornanu sodného, pak do vody a nakonec se vodou dokonale vypláchnou.

22. Pro oba modely lze použít vhodné způsoby provzdušňování kalu v aerační nádrži, například různé provzdušňovací krychličky (rozvaděče) a tlakový vzduch. Pokud je to nutné, musí být vzduch čištěn, například vhodným filtrem a promýváním. Provzdušňování musí být dostatečné, aby byly v systému po celou dobu zkoušky zajištěny aerobní podmínky a dokonalá suspenze vloček kalu.

Filtrační přístroj nebo odstředivka

23. Přístroj pro membránovou filtraci s filtry vhodné velikosti pórů (průměr pórů 0,45 μm), které co nejméně adsorbují rozpustné organické chemické látky nebo uvolňují organický uhlík. Pokud použité filtry uvolňují organický uhlík, promyjí se pečlivě horkou vodou, aby byl odstraněn vyluhovatelný organický uhlík. Lze použít rovněž odstředivku, která je schopna dosáhnout odstředivého zrychlení 40 000 m/s^2.

Analytické vybavení

24. Zařízení pro stanovení:

— DOC (rozpuštěného organického uhlíku) a TOC (celkového organického uhlíku), nebo CHSK (chemické spotřeby kyslíku),

— případně pro stanovení určité chemické látky,

— nerozpuštěných tuhých látek, hodnoty pH a koncentrace kyslíku ve vodě,

— teploty, zásaditosti a kyselosti,

— jestliže systém pracuje s nitrifikací, pak vybavení pro stanovení amoniakálního, dusitanového a dusičnanového dusíku.

Voda

25. Vodovodní voda s koncentrací DOC menší než 3 mg/l. Určení zásaditosti, pokud již není známé.

26. Deionizovaná voda s koncentrací DOC menší než 2 mg/l.

Organické médium

27. Jako organické médium je přípustná syntetická odpadní voda, splašková odpadní voda nebo jejich směs. Bylo prokázáno (11), (14), že použití samotné splaškové odpadní vody často vede k většímu procentu odstranění DOC, a dokonce umožňuje odstranění a biologický rozklad některých chemických látek, které se při užití syntetické odpadní vody dle OECD biologicky nerozloží. Kontinuální nebo přerušované přidávání splaškové odpadní vody rovněž často vede ke stabilizaci aktivovaného kalu včetně zásadní schopnosti dobrého usazování. Proto se doporučuje použití splaškové odpadní vody. Koncentrace DOC nebo CHSK se stanovuje v každé nové šarži organického média. Má být známa kyselost nebo zásaditost organického média. Organické médium může vyžadovat přidání vhodného pufru (hydrogenuhličitan sodný nebo dihydrogenfosforečnan draselný) v případě, že má nízkou kyselost nebo zásaditost, s cílem udržet pH v aerační nádobě v průběhu zkoušky na hodnotě přibližně 7,5 ± 0,5. V každém jednotlivém případě je nutné rozhodnout o množství pufru, které má být přidáno, a době jeho přidání. Ať už jsou směsi přidávány kontinuálně nebo přerušovaně, musí být hodnota DOC (nebo CHSK) ve směsi udržována na přibližně konstantní hodnotě, např. zředěním vodou.

▼M4

Syntetická odpadní voda

28. V 1 litru vodovodní vody se rozpustí: pepton: 160 mg; masový extrakt: 110 mg; močovina, 30 mg; bezvodý hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4): 28 mg; chlorid sodný (NaCl): 7 mg; dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; heptahydrát síranu hořečnatého ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Tato syntetická odpadní voda (OECD médium) je modelovým příkladem a vykazuje průměrnou koncentraci DOC v přítoku přibližně 100 mg/l. Další možností je použít jiná složení o přibližně stejné koncentraci DOC, která se více blíží skutečnému složení odpadní vody. Je-li potřeba užít přítok s nižší koncentrací, ředí se syntetická odpadní voda vodovodní vodou například v poměru 1:1 na koncentraci přibližně 50 mg/l. Taková slabší koncentrace přítoku umožní lepší růst nitrifikačních organismů a tato úprava by měla být použita v případě, že je třeba zkoumat simulaci čistíren odpadních vod pracujících s nitrifikací. Tuto syntetickou odpadní vodu lze připravit v destilované vodě v koncentrované podobě a uchovávat při teplotě asi 1 °C po dobu až jednoho týdne. V případě potřeby lze zředit vodovodní vodou. (Toto médium je nevyhovující, např. koncentrace dusíku je velmi vysoká, obsah uhlíku je relativně nízký, avšak nebyla navržena žádná lepší varianta kromě přidání dalšího fosfátu jako pufru a více peptonu).

Splašková odpadní voda

29. Použije se čerstvá odsazená odpadní voda odebíraná každý den z čistírny, která čistí převážně splaškové domovní odpadní vody. Odebírá se před primární sedimentací z přepadu mechanického stupně čistírny nebo z přítoku do čistírny pracující s aktivovaným kalem, a musí z ní být z větší části odstraněny hrubé částice. Odpadní voda může být uchovávána po několik dní (ale zpravidla ne déle než sedm dní) přibližně při 4 °C, pokud se prokáže, že hodnota DOC (nebo CHSK) se během uchovávání výrazně nesníží (tj. o více než 20 %). K zamezení poruchového provozu systému se před použitím adjustuje DOC (nebo CHSK) u každé nové šarže na příslušnou stálou koncentraci, např. zředěním vodovodní vodou.

Aktivovaný kal

30. Pro inokulaci se odebere aktivovaný kal z aerační nádrže dobře pracující čistírny odpadních vod nebo z laboratorního modelu aktivace, který pracuje převážně se splaškovou odpadní vodou.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

31. U chemikálií s dostatečnou rozpustností se připraví zásobní roztok zkoušené chemické látky vhodné koncentrace (např. 1 až 5 g/l) v deionizované vodě nebo v minerální složce syntetické odpadní vody (u nerozpustných a těkavých látek viz dodatek 5). V zásobním roztoku se stanoví DOC a celkový organický uhlík (TOC) a měření se u každé nové šarže zopakuje. Jestliže je rozdíl mezi DOC a TOC větší než 20 %, ověří se rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě. DOC nebo koncentrace zkoušené chemické látky stanovená v zásobním roztoku specifickou analýzou se porovná se jmenovitou hodnotou, aby se zjistilo, zda je analytická výtěžnost dostatečná (obvykle lze očekávat > 90 %). Zhodnotí se, zvláště u disperzí, zda může být DOC použit jako analytický ukazatel nebo zda lze použít jen analytickou techniku specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku. Vzorky s disperzí je nutné odstředit. V každé nové šarži se stanoví hodnoty DOC, CHSK nebo zkoušené chemické látky pomocí specifické analýzy.

▼M4

32. V zásobním roztoku se stanoví hodnota pH. Extrémní hodnoty indikují, že přidání chemické látky může ovlivňovat hodnotu pH aktivovaného kalu ve zkušebním systému. V takovém případě se zásobní roztok neutralizuje na hodnotu pH 7 ± 0,5 malým objemem anorganické kyseliny nebo zásady. Nesmí však dojít k vysrážení zkoušené chemické látky.

POSTUP

33. Tento postup platí pro zařízení s aktivovaným kalem. Pro zkoušku v modelu s porézní nádobou musí být mírně upraven.

Příprava inokula

34. Zkušební zařízení se na počátku zkoušky inokuluje buď aktivovaným kalem, nebo inokulem s nízkou koncentrací mikroorganismů. Inokulum se provzdušňuje při pokojové teplotě až do doby použití a použije se během 24 h. V prvním případě se vzorek aktivovaného kalu odebere z aerační nádrže dobře pracující biologické čistírny odpadních vod nebo z laboratorního modelu aktivace, který pracuje převážně se splaškovou odpadní vodou. Při simulaci nitrifikačních podmínek se odebere kal z čistírny odpadních vod pracující s nitrifikací. Stanoví se koncentrace sušiny, a pokud je to nutné, koncentruje se kal usazováním tak, aby objem kalu přidávaný do zkušebního modelu byl co nejmenší. Počáteční koncentrace sušiny kalu musí být přibližně 2,5 g/l.

35. Ve druhém případě se jako inokulum použijí 2 ml/l až 10 ml/l odtoku z biologické čistírny splaškových odpadních vod. Aby se získalo dostatečné zastoupení různých bakteriálních druhů, je vhodné použít inokula z různých dalších zdrojů, například z povrchové vody. V takovém případě se aktivovaný kal vyvíjí a roste ve zkušebním modelu.

Dávkování organického média

36. Je nutné zajistit důkladné vyčištění sběrných nádob na přítok a na odtok a trubek vedoucích z nádob na přítok a do nádob na odtok, aby se zabránilo růstu mikroorganismů na počátku zkoušky i v celém jejím průběhu. Zkušební zařízení se sestaví v místnosti s kontrolovanou teplotou (obvykle v rozmezí 20–25 °C) nebo se použije zkušební zařízení s vodním pláštěm. Připraví se dostatečný objem požadovaného organického média (odstavce 27–29). Nejprve se aerační a dosazovací nádrž naplní organickým médiem a potom se přidá inokulum (odstavce 34, 35). Intenzita provzdušňování se nastaví tak, aby byl kal udržován ve vznosu a v aerobním stavu. Potom se začne s dávkováním přítoku a recyklací usazeného kalu. Organické médium se dávkuje ze zásobních nádob do aeračních nádrží (odstavce 20, 21) zkušebního a kontrolního modelu a příslušné odtoky se shromažďují v obdobných zásobnících. Aby se dosáhlo obvyklé hydraulické doby zdržení 6 h, dávkuje se 0,5 litru organického média za 1 h. Pro potvrzení této rychlosti je nutno měřit dávkovaný denní objem organického média zjišťováním snížení objemu média v zásobnících. Pro stanovení účinků přerušovaného uvolňování a nárazového dávkování chemických látek by bylo nezbytné použít jiné způsoby dávkování

37. Jestliže je organické médium připraveno k použití po dobu delší než 1 den, je nutné je ochladit přibližně na 4 °C, případně použít jinou vhodnou metodu ochrany proti růstu mikroorganismů a biologickému rozkladu mimo zkušební zařízení (odstavec 29). Jestliže se používá syntetická odpadní voda, je možné připravit a uchovat při teplotě přibližně 4 °C koncentrovaný zásobní roztok (např. odpovídající desetinásobku běžné koncentrace, odstavec 28). Tento zásobní roztok lze před použitím snadno zředit odpovídajícím objemem vodovodní vody; lze jej rovněž čerpat přímo a odpovídající objem vodovodní vody čerpat zvlášť.

▼M4

Dávkování zkoušené chemické látky

38. Příslušný objem zásobního roztoku zkoušené chemické látky (odstavec 31) se buď přidá do zásobní nádoby přítoku, nebo se dávkuje samostatným čerpadlem přímo do aerační nádrže. Obvyklá průměrná zkušební koncentrace v přítoku by se měla pohybovat mezi 10 mg/l až 20 mg/l DOC, nemá však být vyšší než 50 mg/l. Pokud je zkoušená chemická látka málo rozpustná ve vodě nebo se mohou projevit její toxické účinky, lze snížit koncentraci DOC na 5 mg/l nebo i níže, pouze však za předpokladu, že je k dispozici vhodná specifická analytická metoda a že je rovněž provedena (dispergované zkoušené chemické látky s malou rozpustností se mohou dávkovat zvláštními způsoby, viz dodatek 5).

39. Zkoušená chemická látka se začne přidávat až po dosažení ustáleného stavu systému, kdy dochází k účinnému odstraňování DOC z biologického média (účinnost kolem 80 %). Je nutno dbát na to, aby všechny modely před přidáním zkoušené chemické látky pracovaly se stejnou účinností; pokud tomu tak není, doporučuje se smíchat jednotlivé kaly a znovu rozdělit stejné objemy do jednotlivých modelů. Při použití inokula s (přibližně) 2,5 g/l (sušiny) aktivovaného kalu lze přidávat zkoušenou chemickou látku hned od počátku zkoušky vzhledem k tomu, že přímé přídavky rostoucích dávek zkoušené chemické látky od počátku zkoušky mohou mít tu výhodu, že aktivovaný kal se na tuto látku lépe adaptuje. Bez ohledu na způsob přidání zkoušené chemické látky se doporučuje měřit v pravidelných intervalech průtok a/nebo objem v zásobní nádobě.

Nakládání s aktivovaným kalem

40. Koncentrace tuhých látek v aktivovaném kalu se během zkoušky obvykle ustaluje v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (sušiny) nezávisle na použitém inokulu a tato koncentrace závisí na jakosti a koncentraci organického média, na provozních podmínkách, na druhu přítomných mikroorganismů a na vlivu zkoušené chemické látky.

41. Buď se stanovuje koncentrace suspendovaných tuhých látek aktivovaného kalu v aeračních nádobách nejméně jednou týdně a odstraňuje se přebytečný kal tak, aby se koncentrace udržovala v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (sušiny), nebo se udržuje průměrné stáří kalu na konstantní hodnotě zpravidla v rozsahu od 6 dnů do 10 dnů. Pokud se například zvolí doba zdržení kalu 8 dnů, odstraní se denně 1/8 objemu aktivovaného kalu z aerační nádrže a odlije se. To se provádí denně, nebo nejlépe přerušovaným automatickým provozem čerpadla. Udržování koncentrace suspendovaných tuhých látek aktivovaného kalu na konstantní úrovni nebo v úzkém rozmezí neznamená udržování konstantní doby zdržení kalu (SRT), která je provozní proměnnou určující hodnotu koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku.

42. Během zkoušky se nejméně jednou denně stírá kal ulpívající na stěnách aerační a dosazovací nádrže tak, aby došlo k jeho resuspenzi. Všechny trubky a potrubí se pravidelně kontrolují a čistí, aby se zabránilo růstu biofilmu. Usazený kal v dosazovací nádrži se vrací do aerační nádrže přednostně občasným čerpáním. V modelu s porézní nádobou neprobíhá recyklace, ale dříve, než objem v nádobě výrazně stoupne, je nutno zajistit vložení čistých vnitřních nádob (odstavec 21).

43. V Husmannově modelu může docházet ke špatnému usazování a ztrátám kalu v důsledku jeho špatné usaditelnosti. Tomu je možné zabránit použitím jednoho nebo více níže uvedených opatření, která se mají provádět paralelně jak ve zkušebním, tak v kontrolním modelu:

— v pravidelných intervalech (např. každý týden) může být přidáván čerstvý kal nebo flokulační činidlo (například 2 ml 50 g $FeCl_3$ v 1 litru na nádobu), avšak je nutno dbát na to, aby $FeCl_3$ nereagoval se zkoušenou chemickou látkou, ani ji nesrážel,

▼M4

— mamutka může být nahrazena peristaltickým čerpadlem a recirkulace kalu upravena tak, aby přibližně odpovídala přítoku, což umožní vytvoření anaerobní zóny v usazeném kalu (geometrie mamutky omezuje minimální rychlost vracení kalu přibližně na dvanáctinásobek rychlosti přítoku),

— kal může být čerpán z dosazovací do aerační nádrže přerušovaně (např. 5 minut během 2,5 hodiny), aby se recirkuloval 1 litr až 1,5 litru kalu za hodinu,

— aby se zabránilo ztrátám kalu pěněním, lze dávkovat co nejmenší koncentrace netoxického odpěňovacího činidla (např. silikonového oleje),

— vzduch může být přerušovaně v krátkých intervalech přiváděn do sedimentujícího kalu v dosazovací nádrži (např. po dobu 10 sekund každou hodinu),

— organické médium může být dávkováno do aerační nádrže přerušovaně (např. 3–10 minut během každé hodiny).

Odběr vzorků a analýza

44. V pravidelných intervalech se měří koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a hodnota pH aktivovaného kalu v aerační nádrži. Musí se zajistit vždy dostatečná koncentrace kyslíku (> 2 mg/l) a udržovat požadovaný rozsah teploty (obvykle od 20 °C do 25 °C). Hodnota pH se udržuje na 7,5 ± 0,5 dávkováním malých objemů anorganické zásady nebo kyseliny do aerační nádrže nebo do přítoku nebo zvýšením tlumivé kapacity organického média (viz odstavec 27). Při nitrifikaci dochází ke vzniku kyseliny, přičemž při oxidaci 1 mg N vznikne ekvivalent přibližně 7 mg CO_3–. Četnost měření závisí na měřeném ukazateli a na stabilitě systému a může se pohybovat v denních nebo týdenních intervalech.

45. Změří se DOC nebo CHSK v přítocích kontrolní nádrže a zkušební nádrže (modelu). Změří se koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku zkušebního modelu specifickou analýzou, případně se stanoví odhadem podle koncentrace zkoušené chemické látky v zásobním roztoku (odstavec 31), z použitého objemu a z množství odpadní vody dávkované do zkušebního zařízení. Aby se snížila variabilita údajů o koncentracích, doporučuje se koncentraci zkoušené chemické látky stanovit výpočtem.

46. Odebírají se vhodné objemy vzorků odtoku (např. 24h směsný vzorek) a filtrují se pomocí membrány o průměru pórů 0,45 μm nebo se odstřeďují při odstředivém zrychlení zhruba 40 000 m/s^2 po dobu přibližně 15 min. Je-li filtrace obtížná, použije se odstřeďování. Pro zjištění úplného biologického rozkladu se stanovuje DOC nebo CHSK v každém vzorku nejméně dvakrát, a pokud je to nutné, zjišťuje se primární biologický rozklad specifickým stanovením zkoušené chemické látky.

47. Při použití CHSK mohou vzniknout analytické problémy při nízkých koncentracích, a proto se doporučuje používat CHSK jen při dostatečně vysokých hodnotách zkušební koncentrace (přibližně 30 mg/l). Jestliže se zkoušená chemická látka značně adsorbuje, doporučuje se, aby se množství adsorbované látky na kalu změřilo analytickou metodou specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku.

48. Četnost odběru vzorků závisí na očekávané době trvání zkoušky. Doporučená četnost odběrů jsou tři vzorky za 1 týden. Jakmile modely pracují s dostatečnou účinností, pak po přídavku zkoušené chemické látky bývá adaptace a ustáleného stavu dosaženo po 1 týdnu až 6 týdnech provozu. Pro výpočet výsledku zkoušky se použije nejméně 15 platných hodnot získaných v ustáleném stavu (odstavec 59), která zpravidla trvá 3 týdny. Zkouška může být ukončena, jakmile bylo dosaženo dostatečného stupně odstranění (např. > 90 %) a je k dispozici těchto 15 hodnot, které představují analýzy provedené v jednotlivých pracovních dnech po dobu 3 týdnů. Doba zkoušky po přidání zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit 12 týdnů.

▼M4

49. Jestliže dochází k nitrifikaci kalu a je-li potřeba zkoumat dopady zkoušené chemické látky na nitrifikaci, analyzují se vzorky z odtoku zkušebního i kontrolního modelu nejméně jednou týdně a stanoví se v nich amoniak a/nebo dusitan a dusičnan.

50. Všechny analýzy se provedou co nejdříve, zejména stanovení dusíku. Je-li nutné analýzy odložit, musí být vzorky uchovávány přibližně při 4 °C v temnu ve zcela naplněných a dobře uzavřených lahvičkách. Je-li zapotřebí uchovat vzorky déle než 48 h, konzervují se zmrazením, okyselením (např. přídavkem 10 ml/l roztoku kyseliny sírové koncentrace 400 g/l) popř. vhodnou toxickou látkou (např. přídavkem 20 ml/l roztoku chloridu rtuťnatého koncentrace 10 g/l). Ověří se, zda použitý způsob konzervace neovlivní výsledky analýzy.

Zkouška se spřaženým zařízením

51. Jestliže se používá spřažené zařízení (dodatek 3), vymění se každý den stejné množství aktivovaného kalu (150 ml až 1 500 ml pro aerační nádrž objemu 3 l směsi) mezi aeračními nádržemi zkušebního a kontrolního modelu. Pokud se zkoušená chemická látka silně adsorbuje na kal, vymění se pouze supernatant v dosazovacích nádržích. V obou případech se pro výpočet výsledků zkoušky použije korekční faktor (odstavec 55).

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

52. Stupeň odstranění zkoušené chemické látky v procentech DOC nebo CHSK pro každý časový odhad se vypočte podle rovnice:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kde

D_t = stupeň odstranění DOC nebo CHSK v čase t vyjádřený v procentech

C_s = koncentrace DOC nebo CHSK zkoušené chemické látky v přítoku v mg/l, přednostně stanovená odhadem ze zásobního roztoku

E = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t

E_o = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku z kontrolního modelu v mg/l v čase t

53. Stupeň odstranění organického média prostřednictvím DOC nebo CHSK v kontrolní jednotce je užitečnou informací k posouzení biodegradační aktivity aktivovaného kalu během zkoušky. Stupeň odstranění organického média se vypočte podle rovnice:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kde

D_B = stupeň odstranění organického média vyjádřený v procentech DOC nebo CHSK v kontrolním modelu v čase t

C_M = koncentrace DOC nebo CHSK organického média v přítoku do kontrolního modelu v mg/l

▼M4

Nepovinně se vypočte procento odstranění DOC nebo CHSK organického média a zkoušené chemické látky ve zkušebním zařízení podle rovnice:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kde

D_T = stupeň odstranění DOC nebo CHSK v celkovém přítoku do zkušebního modelu vyjádřený v procentech

C_T = DOC nebo CHSK v celkovém přítoku do zkušebního modelu nebo vypočtený na základě zásobních roztoků v mg/l

54. Stupeň odstranění zkoušené chemické látky stanovený specifickou analytickou metodou při každém hodnocení v čase se vypočte podle rovnice:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kde

D_{ST} = stupeň primárního odstranění zkoušené chemické látky v čase t vyjádřený v procentech

S_i = změřená nebo vypočtená koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku do zkušebního modelu v mg/l

S_e = změřená koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t

55. Jestliže se používá spřažené zařízení, upraví se ředění zkoušené chemické látky v aerační nádrži o výměnu kalu a použije se korekční faktor (viz dodatek 3). Jestliže je průměrná hydraulická doba zdržení 6 h a vymění se polovina objemu aktivovaného kalu v aeračních nádržích, je pro získání skutečného stupně odstranění zkoušené chemické látky D_{tc} nutné upravit stanovené denní hodnoty odstranění (D_t, odstavec 52) na základě rovnice:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Vyjadřování výsledků zkoušky

56. Do grafu se vynese procento odstranění D_t (nebo D_{tc}) a D_{ST}, pokud je k dispozici, v závislosti na čase (viz dodatek 2). Z tvaru této křivky odstranitelnosti zkoušené chemické látky (samostatně nebo jako DOC) lze vyvodit některé závěry o postupu odstraňování.

Adsorpce

57. Je-li hned na počátku zkoušky pozorován vysoký stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky, je zkoušená chemická látka pravděpodobně odstraňována adsorpcí na sušině aktivovaného kalu. To je možné ověřit stanovením adsorbované zkoušené chemické látky specifickou analýzou. Není obvyklé, aby stupeň odstranění DOC adsorbovatelných chemických látek zůstával vysoký v celém průběhu zkoušky; vysoký stupeň odstranění je zpravidla pozorován na počátku zkoušky a později klesne na rovnovážnou hodnotu. Pokud ale adsorbovatelná zkoušená chemická látka byla schopna tak či onak způsobit aklimatizaci populace mikroorganismů, stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky by následně vzrostl a dosáhl vysoké hodnoty ve fázi prodlevy.

▼M4

Lagová fáze

58. Obdobně jako u statických screeningových zkoušek musí u řady zkoušených látek dříve, než proběhne úplný biologický rozklad, proběhnout lagová fáze. V lagové fázi dochází k aklimatizaci nebo adaptaci rozkládajících se bakterií, přičemž nedochází téměř k žádnému úbytku zkoušené chemické látky; následně dochází k počátečnímu růstu těchto baktérií. Tato fáze končí a má se za to, že začíná fáze rozkladu, po úbytku přibližně 10 % počátečního množství zkoušené chemické látky (po zohlednění adsorpce, pokud k ní dojde). Lagová fáze je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Prodleva

59. Fáze prodlevy křivky odstranitelnosti při kontinuální zkoušce je definována jako fáze, v níž dochází k maximálnímu rozkladu. Fáze prodlevy musí trvat nejméně 3 týdny a musí mít alespoň 15 změřených platných hodnot.

Průměrný stupeň odstranění zkoušené chemické látky

60. Střední hodnota se vypočte z hodnot odstranění (D_t) zkoušené chemické látky ve fázi prodlevy. Po zaokrouhlení na nejbližší celé číslo (1 %) získáme stupeň odstranění zkoušené chemické látky. Doporučuje se rovněž vypočítat 95 % konfidenční interval této střední hodnoty.

Odstranění organického média

61. Do grafu se vynese procento odstranění DOC nebo CHSK organického média v kontrolním zařízení (D_B) v závislosti na čase. Průměrný stupeň odstranění se označí stejně jako u zkoušené chemické látky (odstavec 60).

Indikace biologické rozložitelnosti

62. Jestliže se zkoušená chemická látka výrazně neadsorbuje na aktivovaném kalu a křivka odstranitelnosti vykazuje typický průběh biologického rozkladu s lagovou fází, fází rozkladu a fází prodlevy (odstavce 58, 59), lze změřené odstranění zkoušené chemické látky bezpečně přisoudit jejímu biologickému rozkladu. Dojde-li na počátku zkoušky k velkému odstranění, nemůže tato simulační zkouška rozlišit biologické a abiotické eliminační procesy. V takovém případě a také v jiných případech, kdy jsou pochybnosti o biologické rozložitelnosti (např. jestliže dochází ke stripování), se zjišťuje adsorpce zkoušené chemické látky nebo se provádějí další statické zkoušky biologické rozložitelnosti založené na ukazatelích jednoznačně indikujících biologické procesy. Takovými zkouškami jsou metoda zkoumání spotřeby kyslíku (kapitola C.4 D, E a F této přílohy (6)) nebo metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého (kapitola C.4 C této přílohy (6)) nebo metoda ISO Headspace (18) s využitím adaptovaného inokula ze simulační zkoušky. Pokud byly změřeny procentuální hodnoty jak odstranění DOC, tak odstranění konkrétních chemických látek, a existují-li mezi těmito hodnotami významné rozdíly (u DOC nižší hodnoty, u konkrétních látek vyšší), pak to naznačuje přítomnost organických meziproduktů v odpadních vodách, které mohou být obtížněji rozložitelné než výchozí chemická látka.

Platnost výsledků zkoušky

63. Stanovením stupně biologického rozkladu organického média (odstavec 53) v kontrolním modelu se získají informace o normální biologické rozložitelnosti inokula. Zkouška se považuje za platnou, jestliže je v kontrolním modelu stupeň biologického rozkladu podle DOC nebo CHSK po 2 týdnech větší než 80 % a nebyly pozorovány žádné neobvyklé jevy.

▼M4

64. Pokud byla užita snadno biologicky rozložitelná (referenční) chemická látka, měl by být stupeň biologického rozkladu (D_t, odstavec 52) > 90 %.

65. Jestliže je zkouška provedena za nitrifikačních podmínek, měla by být průměrná odtoková koncentrace < 1 mg/l amoniakálního dusíku a < 2 mg/l dusitanového dusíku.

66. Pokud tato kritéria (odstavce 63–65) nebyla splněna, je třeba zkoušku opakovat s použitím inokula z jiného zdroje, provést zkoušku referenční chemické látky a přezkoumat všechny experimentální postupy.

Protokol o zkoušce

67. V protokolu o zkoušce musí být uvedeny tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— údaje nutné k identifikaci,

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně -chemické vlastnosti.

Zkušební podmínky:

— typ zkušebního zařízení, jakákoli úprava za účelem zkoušek nerozpustných a těkavých látek,

— typ organického média,

— podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,

— inokulum, charakter a místo/místa odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,

— zásobní roztok zkoušené chemické látky: obsah DOC a TOC, způsob přípravy, jedná-li se o suspenzi, užitá zkušební koncentrace; pokud se tato koncentrace pohybuje mimo rozmezí 10–20 mg/l DOC, důvody, proč tomu tak je, metoda přidávání, datum prvního přidání, jakékoli změny,

— průměrné stáří kalu a průměrná hydraulická doba zdržení, metoda odtahu kalu, metody předcházející bytnění kalu, ztrátě kalu apod.,

— použité analytické metody,

— zkušební teplota,

— vlastnosti kalu, např. bytnění, kalový index (KI), koncentrace aktivovaného kalu,

— údaje o odchylkách od normalizovaného postupu a o dalších okolnostech, které by mohly ovlivnit výsledky.

Výsledky zkoušky:

— všechny změřené údaje (DOC, CHSK, specifické analýzy, hodnota pH, teplota, koncentrace kyslíku, suspendované tuhé látky a sloučeniny dusíky, pokud je to relevantní),

— všechny vypočtené hodnoty D_t (nebo D_{tc}), D_B, D_{ST} v tabelované formě a křivky odstranitelnosti,

— údaje o lagové fázi a fázi prodlevy, doba trvání zkoušky, stupeň odstranění zkoušené chemické látky a stupeň odstranění organického média v kontrolním modelu společně se statistickými informacemi a vyjádřením k biologické rozložitelnosti zkoušené chemické látky a platnosti zkoušky,

— diskuse o výsledcích.

▼**M4**

LITERATURA:

1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation“, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti.

7) Kapitola C.12 této přílohy, Biologická rozložitelnost – modifikovaná zkouška SCAS.

8) Kapitola C.19 této přílohy, Odhad adsorpčního koeficientu (K_{OU}) pro půdy a čistírenské kaly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; přepracována v roce 2004). Stanovení odstranitelnosti a biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - simulační zkouška s aktivovaným kalem.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98 ISBN 011 751661 9.

18) ISO 14593 (1998). Jakost vod – Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách.

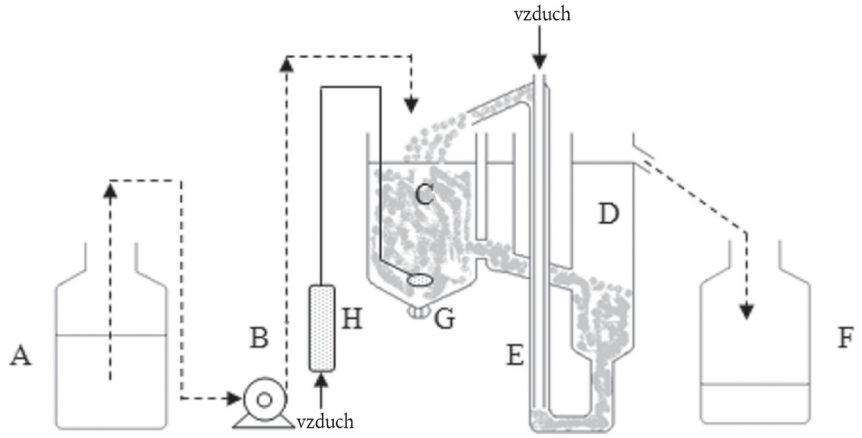
▼M4

Dodatek 1

Obrázek 1

Zařízení použité pro posouzení biologické rozložitelnosti

Husmannův model

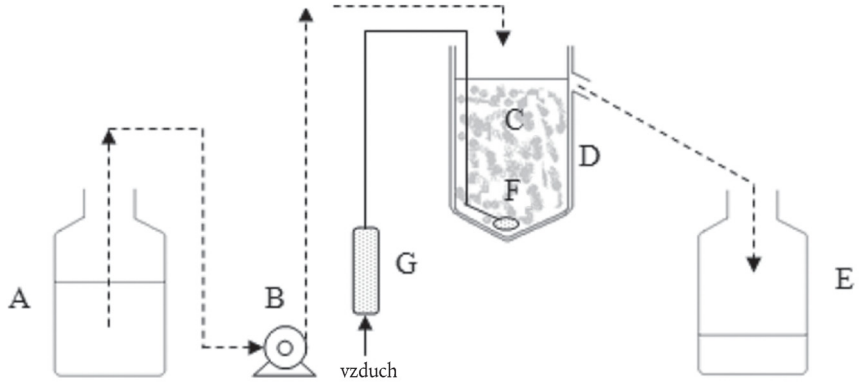


A. zásobník
B. dávkovací čerpadlo
C. aerační nádrž (kapacita 3 l)
D. sedimentační nádrž
E. mamutka
F. sběrná nádrž
G. provzdušňovací zařízení (frita)
H. průtokoměr vzduchu

Obrázek 2

Zařízení použité pro posouzení biologické rozložitelnosti

Porézní nádoba

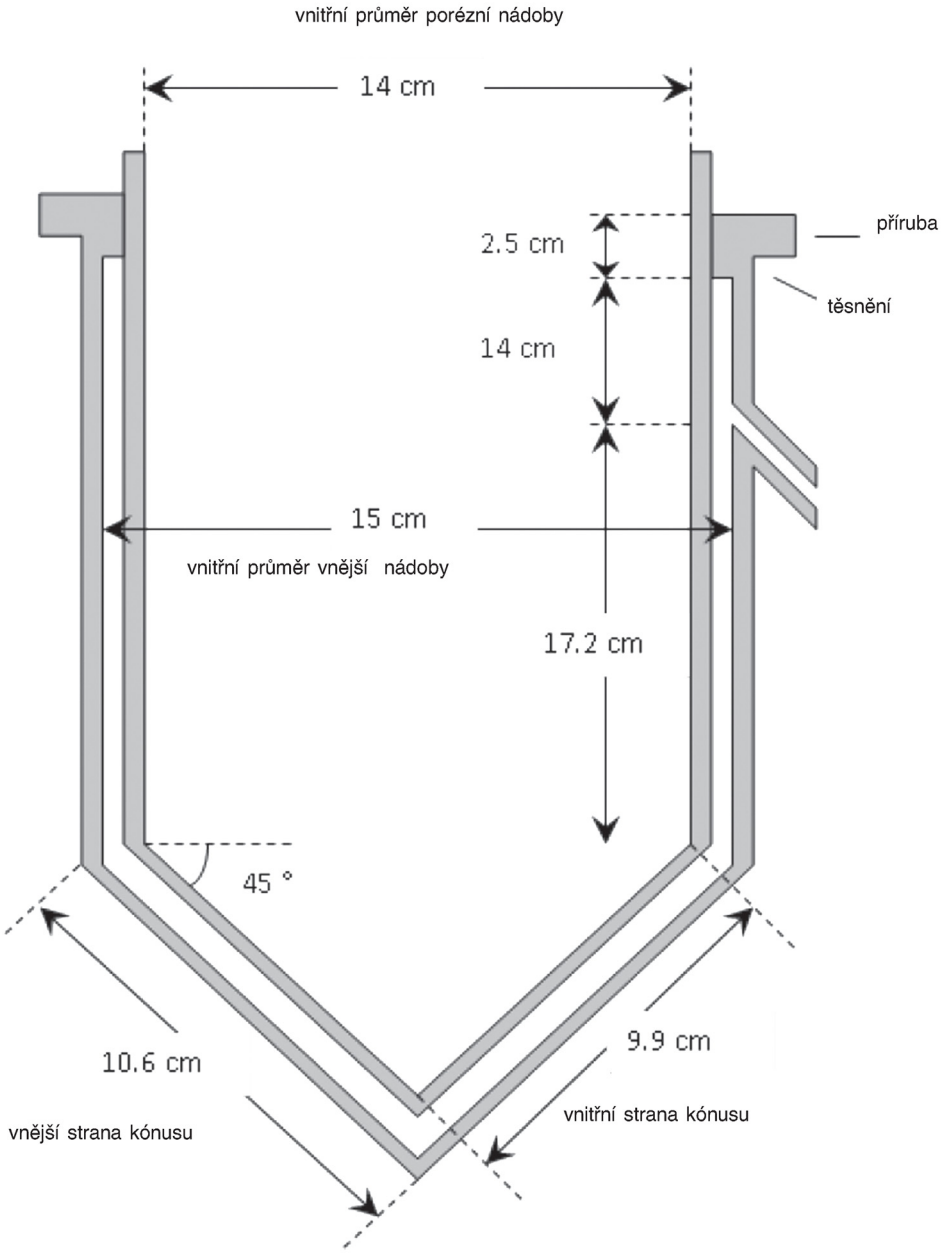


A. zásobník
B. dávkovací čerpadlo
C. porézní nádoba aerační nádrže
D. vnější nepropustná nádoba
E. sběrná nádrž
F. difuzér
G. průtokoměr vzduchu

▼**M4**

Obrázek 3

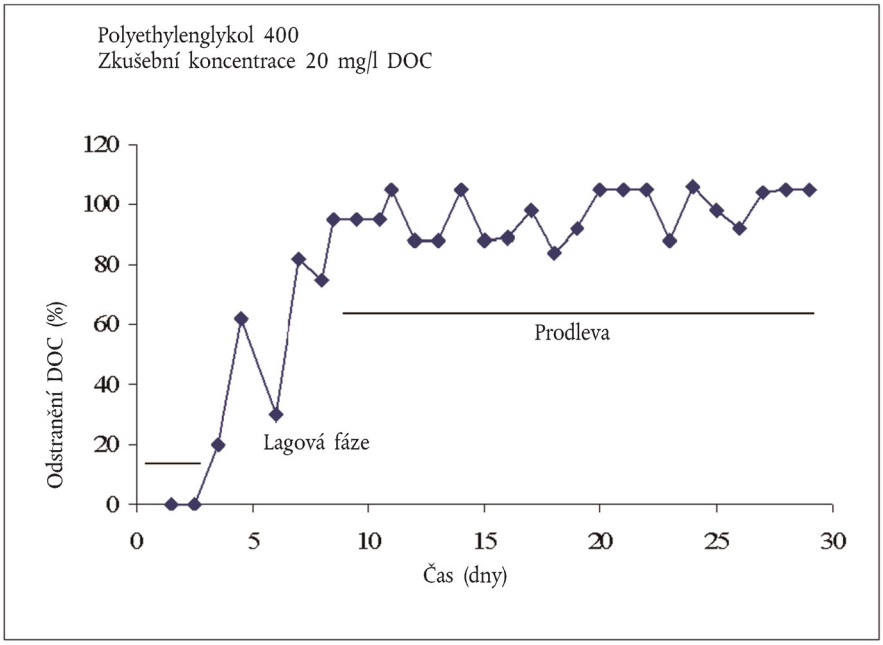
Podrobný popis porézní nádoby třílitrové aerační nádrže



▼**M4**

Dodatek 2

Příklad křivky odstranitelnosti



▼M4

Dodatek 3

[INFORMATIVNÍ]

ZKOUŠKA SE SPŘAŽENÝM ZAŘÍZENÍM

S cílem pokusit se vyrovnat mikrobiální populace v kalech ve zkušebním zařízení, do nějž je vpouštěna odpadní voda a zkoušená chemická látka, a v kontrolním zařízení, do nějž je vpouštěna pouze odpadní voda, byla zavedena denní výměna kalu (1). Tento postup byl nazván spřažením a metoda je známa jako zkouška se spřaženým zařízením. Spřažení bylo původně prováděno pomocí Husmannových modelů aktivovaného kalu, bylo však prováděno i s využitím modelů s porézní nádobou (2)(3). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve výsledcích mezi nespřaženými a spřaženými jednotkami bez ohledu na to, zda se jednalo o Husmannův model nebo model s porézní nádobou, takže vynaložení času a energie na spřažení zařízení by nepřineslo žádnou výhodu.

Výměna kalu může být zdánlivě příčinou značně vysokého stupně odstranění, protože část zkoušené chemické látky se přenáší do druhého modelu a koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu se téměř vyrovná. Proto se používají korekční faktory, jejichž hodnota závisí na objemu vyměňované aktivační směsi a na průměrné hydraulické době zdržení. Podrobnosti pro výpočet byly zveřejněny (1).

Korigovaná hodnota stupně odstranění DOC nebo CHSK se vypočte podle obecné rovnice:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kde

D_{tc} = korigovaný stupeň odstranění DOC nebo CHSK v procentech

D_t = stanovený stupeň odstranění DOC nebo CHSK v procentech

a = vyměněný podíl aktivační směsi mezi jednotkami aktivovaného kalu

r = průměrná hydraulická doba zdržení v hodinách

Jestliže se například vymění polovina objemu aeračních nádrží (a = 0,5) a průměrná hydraulická doba zdržení je 6 h, korekční vzorec je následující:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATURA:

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Dodatek 4

HODNOCENÍ INHIBICE AKTIVOVANÝM KALEM

Postup podle zkoušených chemických látek

1. Při simulační zkoušce nemusí dojít k rozkladu nebo odstranění chemické látky (nebo odpadní vody), která může mít dokonce inhibiční účinek na mikroorganismy v kalu. Jiné chemické látky se biologicky rozkládají v nízkých koncentracích, ale ve vyšší koncentraci působí inhibičně (hormeze). Inhibiční účinky mohou být zjištěny v dřívější fázi nebo mohou být stanoveny zkouškou toxicity s použitím obdobného nebo totožného inokula jako u simulační zkoušky (1). Jedná se o metodu inhibice spotřeby kyslíku (kapitola C.11 této přílohy (2) a ISO 8192(3)), nebo inhibice růstu organismů v kalu (ISO 15522 (4)).

2. V simulační zkoušce se inhibice projeví rozdílem obsahu rozpuštěného organického uhlíku (DOC) nebo chemické spotřeby kyslíku CHSK mezi odtokem ze zkušební nádoby a odtokem z kontrolní nádoby, který bude větší než v případě DOC přidaného jako zkoušená chemická látka. Vyjádřeno jiným způsobem se procento odstranění DOC (a biochemická spotřeba kyslíku BSK, chemická spotřeba kyslíku CHSK a/nebo NH^{+}_{4}) ve zpracovávaném organickém médiu v důsledku přítomnosti zkoušené chemické látky sníží. Pokud k tomu dojde, měla by být zkouška opakována při postupném snižování koncentrace zkoušené chemické látky, dokud nebude dosaženo úrovně, při které nedojde k inhibici; potenciálně lze dále snižovat koncentraci až do doby, kdy bude zkoušená chemická látka biologicky rozložena. Nicméně pokud má zkoušená chemická látka (nebo odpadní voda) na tento proces negativní vliv ve všech zkoušených koncentracích, nasvědčuje to tomu, že tuto chemickou látku je obtížné až nemožné biologicky odstranit, ale může být vhodné opakovat zkoušku s aktivovaným kalem z jiného zdroje a/nebo vystavení kalu postupnější aklimatizaci.

3. Naopak pokud dojde při simulační zkoušce k bioeliminaci zkoušené chemické látky napoprvé, měla by být její koncentrace zvýšena, je-li cílem zjistit, zda by daná chemická látka mohla působit inhibičně.

4. Při snaze zjistit stupeň inhibice je třeba mít na paměti, že populace v aktivovaném kalu se může změnit, takže se v průběhu času u mikroorganismů může vyvinout tolerance vůči inhibující látce.

5. Výpočet stupně inhibice:

   Celkové procento úbytku R_o, BSK, DOC, CHSK atd., ve zkušebních a kontrolních zařízeních lze vypočítat na základě rovnice:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   kde:

   I = koncentrace BSK, DOC, CHSK atd. v přítoku zkušebních nebo kontrolních nádob v mg/l

   E = příslušné koncentrace v odtoku v mg/l.

   I a E musí být korigovány o DOC v důsledku přítomnosti zkoušené chemické látky ve zkušebních zařízeních; v opačném případě budou výpočty procenta inhibice nesprávné.

▼**M4**

Stupeň inhibice způsobené přítomností zkoušené chemické látky lze vypočítat na základě rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

kde:

R_c = procento úbytku v kontrolních nádobách

R_t = procento úbytku ve zkušebních nádobách

LITERATURA:

1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2) Kapitola C.11 této přílohy, Biologická rozložitelnost – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu.

3) ISO 8192 (2007) Jakost vod – Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlíkatých látek a amoniakálního dusíku.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatek 5

Ve vodě těžko rozpustné zkoušené chemické látky – těkavé chemické látky

Ve vodě těžko rozpustné chemické látky

Evidentně bylo zveřejněno jen málo zpráv o podrobení chemických látek těžko rozpustných a nerozpustných ve vodě zkouškám simulujícím čištění odpadních vod (1), (2), (3).

Neexistuje jednotná metoda dispergace zkoušené chemické látky, kterou by bylo možno použít pro všechny nerozpustné chemické látky. Jako vhodné pro pokus o dispergaci zkoušených látek při simulační zkoušce by se jevily dva ze čtyř typů metod popsaných v normě ISO 10634 (4); jedná se o použití emulgačního činidla a/nebo ultrazvukové energie. Měla by být stanovena stabilita výsledné disperze po dobu alespoň 24 h. Vhodně stabilizované disperze v neustále míchaných nádržích (odstavec 38) pak budou nadávkovány do aerační nádrže odděleně od splaškové (nebo syntetické) odpadní vody.

V případě stabilní disperze je nutno prozkoumat způsob stanovení zkoušené chemické látky v dispergované formě. Metoda DOC nebude pravděpodobně pro tento účel vhodná, takže bude třeba stanovit analytickou metodu specifickou pro zkoušenou chemickou látku, kterou bude možno použít pro odtok, tuhé látky v odtoku a aktivovaný kal. Následně se stanoví osud zkoušené chemické látky v simulaci procesu čištění aktivovaným kalem v pevné a kapalné fázi. To znamená, že bude stanovena „hmotnostní bilance“ za účelem rozhodnutí, zda došlo k biologickému rozkladu zkoušené chemické látky. To by však indikovalo pouze primární biologický rozklad. Pokus o prokázání úplného biologického rozkladu by měl proběhnout na základě respirometrické zkoušky na snadnou biologickou rozložitelnost (viz kapitola C.4 této přílohy (5) C, F nebo D), přičemž se jako inokulum použije kal vystavený zkoušené chemické látce při simulační zkoušce.

Těkavé chemické látky

Uplatnění simulace čištění odpadních vod na těkavé chemické látky je sporné a problematické. Obdobně jako u zkoušených látek špatně rozpustných ve vodě bylo publikováno jen velmi málo zpráv popisujících simulační zkoušky pomocí těkavých látek. Konvenční typ kompletního míchadla se upraví utěsněním aeračních a usazovacích nádrží, měřením a regulací průtoku vzduchu pomocí průtokoměrů a vypouštěním výstupního plynu přes zařízení na zachycování těkavých organických látek. V některých případech se použije k vypouštění výstupního plynu vývěva přes „studené“ zachycovací zařízení nebo přes čisticí zachycovací zařízení obsahující Tenax a silikagel pro analýzu pomocí plynové chromatografie. Přítomnost zkoušené chemické látky v zachycovacím zařízení lze stanovit analyticky.

Zkouška se provádí ve dvou částech. Zařízení jsou nejprve spuštěna bez kalu, přičemž se do aerační nádrže čerpá syntetická odpadní voda a zkoušená chemická látka. Vzorky přítoku, odtoku a výstupního plynu se po dobu několika dnů shromažďují a analyzují na zkoušenou chemickou látku. Ze shromážděných údajů lze vypočítat procentní podíl (R_{vs}) zkoušené chemické látky odstraněné ze systému.

Následně je provedena normální biologická zkouška (s kalem) za stejných provozních podmínek jako ve stripovací studii. Jsou provedena také měření DOC nebo CHSK s cílem zkontrolovat efektivní fungování zařízení. V první části zkoušky jsou prováděny příležitostné analýzy ke stanovení zkoušené chemické látky v přítoku, odtoku a výstupním plynu; po aklimatizaci se analýzy provádějí častěji. Opět platí, že z údajů v ustáleném stavu lze vypočítat procento odstranění zkoušené chemické látky z kapalné fáze všemi procesy (R_T) (fyzikálními i biologickými) i podíl látek (R_V), odstraněných ze systému.

▼M4

Výpočet:

a) V nebiologické zkoušce lze procentní podíl (R_{VP}) zkušebního materiálu odstraněného ze systému vypočítat pomocí následující rovnice:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kde

R_{VP} = odstranění zkoušené chemické látky těkáním (%),

S_{VP} = zkoušená chemická látka shromážděná v zařízení pro zachycování vyjádřená jako ekvivalentní koncentrace v kapalné fázi v mg/l,

S_{IP} = koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku (mg/l).

b) V biologické zkoušce lze procentní podíl (R_V) zkušebního materiálu odstraněného ze systému vypočítat pomocí následující rovnice:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kde

R_V = odstranění zkoušené chemické látky těkáním při biologické zkoušce (v %),

S_V = zkoušená chemická látka shromážděná v zařízení pro zachycování při biologické zkoušce vyjádřená jako ekvivalentní koncentrace v kapalném přítoku v mg/l,

S_I = koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku v mg/l.

c) V biologické zkoušce se procento (R_T) zkoušené chemické látky odstraněné všemi procesy vypočte pomocí následující rovnice:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kde

S_E = koncentrace zkoušené chemické látky v (kapalném) odtoku v mg/l.

d) Procentní podíl (R_{BA}) odstraněný biologickým rozkladem a adsorpcí lze tedy vypočítat na základě rovnice:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Měly by být provedeny samostatné zkoušky s cílem zjistit, zda je zkoušená chemická látka adsorbována; pokud tomu tak je, lze provést další korekci.

e) Srovnání mezi podílem zkoušené chemické látky odstraněné z biologických (R_v) a nebiologických (R_{vp}) zkoušených systémů naznačuje celkový dopad biologického čištění na emise zkoušené chemické látky do atmosféry.

Příklad: benzen

doba zdržení kalu = 4 dny

syntetická odpadní voda; doba zdržení = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Platí tedy, že

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % a R_{BA} = 85 %.

Předpokládalo se, že benzen není absorbován na kal.

LITERATURA:

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Jakost vod - Pokyny pro přípravu a zpracování ve vodě těžko rozpustných organických látek pro následující hodnocení jejich biologické rozložitelnosti ve vodním prostředí

5) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti.

▼M4

Dodatek 6

Vliv doby zdržení kalu (SRT) na odstranitelnost chemických látek

ÚVOD

1. Metoda popsaná v hlavní části textu byla navržena ke zjištění, zda zkoušené chemické látky (zpravidla takové, o nichž je známo, že jsou biologicky rozložitelné, avšak nikoli snadno biologicky rozložitelné) podléhají biologickému rozkladu v mezích vyžadovaných v čistírnách odpadních vod. Výsledky jsou vyjadřovány v procentech úbytku a v procentech biologického rozkladu. Podmínky provozu jednotek aktivovaného kalu a volba přítoku dovolují spíše širší rozpětí koncentrací zkoušené chemické látky v odtoku. Zkoušky jsou prováděny pouze při jedné jmenovité koncentraci suspendovaných látek nebo při jedné jmenovité době zdržení kalu (SRT) a popsané režimy odtahování mohou způsobit při zkoušce značné kolísání doby zdržení kalu jak den ode dne, tak během dne.

2. V této variantě (1), (2) je popsána metoda regulace doby zdržení kalu v mnohem užším rozmezí v průběhu každého 24hodinového období (obdobně jako ve větším měřítku), které může mít za následek ustálenější koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku. Doporučuje se použít splaškovou odpadní vodu vzhledem k tomu, že vykazuje konzistentnější a vyšší procenta úbytku. Jsou rovněž zkoumány účinky řady hodnot doby zdržení kalu a v podrobnější studii mohou být stanoveny účinky rozmezí teplot na koncentraci chemické látky v odtoku.

3. Dosud neexistuje obecná shoda ohledně toho, které modely kinetiky působí při biologickém rozkladu chemických látek za podmínek panujících při čištění odpadních vod. Byl zvolen Monodův model růstu baktérií a využití substrátu (1), (2), který bude uplatněn na shromážděné údaje vzhledem k tomu, že tato metoda měla být použita pouze na chemické látky vyráběné ve velkých objemech, což má za následek koncentrace v odpadní vodě nad 1 mg/l. Platnost zjednodušeného modelu a užitých předpokladů byly stanoveny za použití řady alkoholethoxylátů s různým stupněm primární biologické rozložitelnosti (2), (3).

Poznámka: Tato variantní metoda úzce sleduje většinu textu této zkušební metody C.10-A a níže jsou uvedeny pouze podrobnosti, které se od ní liší.

PODSTATA ZKOUŠKY

4. Zařízení s porézní nádobou s aktivovaným kalem, určená k (téměř) kontinuálnímu odtahu aktivační směsi umožňující velmi přesné řízení doby zdržení kalu (SRT nebo θ_s) jsou provozována v nespřaženém režimu pro řadu dob zdržení kalu a volitelně i pro řadu teplot. Obvyklá doba zdržení je 2 až 10 dnů při teplotě 5 až 20 °C. Odpadní voda, nejlépe splašková, a roztok zkoušené chemické látky se do zařízení dávkují odděleně takovou rychlostí, aby se dosáhlo požadované doby zdržení kalu (3–6 hodin) a požadované koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku. Kontrolní zařízení se provozují paralelně bez zkoušené chemické látky za účelem srovnání.

5. Lze použít i jiné typy zařízení, ale je nutné věnovat velkou pozornost správné kontrole doby zdržení kalu. Například při použití zařízení obsahujících usazovací nádrže může být nezbytné zohlednit ztrátu tuhých látek odtokem čistírny. Měla by být přijata speciální opatření s cílem zabránit chybám v důsledku kolísání množství kalu v usazovací nádrži.

▼M4

6. Zařízení se provozují při každé zvolené sérii podmínek až do ustáleného stavu a průměrná koncentrace zkoušené chemické látky a případně i DOC se pak stanovuje v odtoku po dobu přibližně tří týdnů. Kromě posouzení procenta úbytku zkoušené chemické látky a případně i DOC se vztah mezi podmínkami provozu čistíren a koncentrací zkoušené chemické látky v odtoku vyjadřuje v grafické formě. Výsledky jsou použitelné pro výpočet předběžných kinetických konstant a předpověď podmínek, za nichž lze zkoušenou chemickou látku čistit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

7. Použije se se kapitola C.10 A, odstavce 12 až 13.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

8. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 14 až 15.

REFERENČNÍ ZKOUŠENÁ CHEMICKÁ LÁTKA

9. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 16.

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ zkoušek

10. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 17 až 18.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Vhodným zařízením je modifikovaný systém s porézní nádobou (dodatek 6.1). Skládá se z vnitřní nádoby (nebo vložky) vyrobené z porézního polypropylenu o síle stěn 3,2 mm, velikosti pórů přibližně 90 μm a s natupo svařenými spoji. (Vznikne tak pevnější zařízení, než je uvedeno v bodě 21 této kapitoly C.10 A) Porézní válec je vložen do vnější nádoby z nepropustného polyetylenu skládající se ze dvou částí: z kruhové základny, ve které jsou vyvrtány dva otvory pro přívod vzduchu a jeden pro odběr kalu, a z horního válce, který je přišroubován na základnu a má odtok umístěn tak, aby udržel daný objem (3 l) v porézní nádobě. Na jeden přívod vzduchu je napojena provzdušňovací krychlička a druhý konec přívodu vzduchu je otevřený a nastavený v pravém úhlu k provzdušňovacímu elementu základny. Toto uspořádání umožňuje potřebnou turbulenci, aby obsah nádoby byl dokonale promícháván a aby byla zajištěna koncentrace rozpuštěného kyslíku větší než 2 mg/l.

12. Odpovídající počet zařízení je udržován při kontrolované teplotě v rozmezí od 5 do 20 °C (±1 °C), a to buď ve vodní lázni nebo v místnosti s konstantní teplotou. Čerpadla musí dávkovat do aeračních nádob roztok zkoušené chemické látky požadovanou rychlostí 0–1,0 ml/min a usazené odpadní vody požadovanou rychlostí 0–25 ml/min a třetí čerpadlo musí odstraňovat odpadní kal z aeračních nádrží Potřebného velmi nízkého průtoku odpadního kalu je dosaženo pomocí čerpadla nastaveného na vyšší rychlost a spouštěného přerušovaně pomocí časového spínače, např. tak, že je v chodu po dobu 10 sekund za minutu, rychlost čerpadla je 3 ml/min a rychlost odtahování kalu 0,5 ml/min.

Filtrační přístroj nebo odstředivka

13. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 23.

Analytické vybavení

14. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 24.

Voda

▼M4

15. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 25 až 26.

Organické médium

16. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 27.

Syntetická odpadní voda

17. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 28.

Splašková odpadní voda

18. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 29.

Aktivovaný kal

19. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 30.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

20. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 31 až 32.

POSTUP

Příprava inokula

21. Použije se pouze kapitola C.10 A, odstavec 34 – užití aktivovaného kalu (přibližně 2,5 g/l).

Počet zkušebních zařízení

22. Pro jednoduchou zkoušku, tzn. k měření procenta úbytku, je zapotřebí pouze jedna hodnota doby zdržení kalu, avšak za účelem získání údajů potřebných pro výpočet předběžných kinetických konstant je potřeba 4 nebo 5 hodnot doby zdržení kalu. Obvykle se volí hodnoty mezi 2 a 10 dny. V praxi je vhodné provádět zkoušku zároveň za stejné teploty při čtyřech nebo pěti různých dobách zdržení kalu; při rozšířených studiích se užijí stejné hodnoty SRT, případně jiný rozsah hodnot, při jiných teplotách v rozsahu 5 až 20 °C. U primárního biologického rozkladu (hlavní využití) je vyžadována zpravidla pouze jedna jednotka na každou sérii podmínek. Pro úplnou biologickou rozložitelnost je však pro každou sérii podmínek zapotřebí kontrolní model, do kterého je vpouštěna odpadní voda, ale nikoli zkoušená chemická látka. Vychází-li se z toho, že v použité odpadní vodě je přítomna zkoušená chemická látka, bylo by při posuzování primárního biologického rozkladu nutné použít kontrolní zařízení a provést nezbytnou korekci výpočtů.

Dávkování organického média a zkoušené chemické látky

23. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 36 až 39, ale je nutné upozornit na to, že roztok zkoušené chemické látky je dávkován samostatně a že jsou užívány různé rychlosti odtahování kalu. Průtok přítoku, odtoku a odtah kalu se pravidelně sleduje, např. dvakrát denně, a pokud je to nutné, upravuje se v intervalu ±10 %. Pokud vzniknou u analytických metod problémy při použití splaškové odpadní vody, provede se zkouška se syntetickou odpadní vodou, ale je třeba zajistit, aby z různých médií vycházela srovnatelná kinetická data.

Nakládání s jednotkami na aktivovaný kal

24. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 40 až 43, ale doba zdržení kalu v kontrolním modelu pouze z hlediska „nepřetržitého“ odtahu kalu.

Odběr vzorků a analýza

25. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 44 až 50 s tou výjimkou, že musí být stanovena koncentrace zkoušené chemické látky, zatímco DOC může být stanoven volitelně; CHSK by se užívat neměl.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

26. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 52 až 54.

Vyjadřování výsledků zkoušky

27. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 56 až 62.

Výpočet kinetických konstant

28. Je realističtější uvádět průměrnou koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku získanou po dosažení ustáleného stavu a popsat, jak se mění podle provozních podmínek čistírny, než uvádět procentuální primární biologický rozklad. To lze provést posouzením rovnice (6) v dodatku 6.2, z níž mohou vyplynout hodnoty K_S, μ_m a θ_{SC} – kritická doba zdržení kalu.

(Případně lze získat přibližné hodnoty K_S a μm pomocí jednoduchého počítačového programu v souladu s teoretickou křivkou vypočtenou podle rovnice 2 (dodatek 6.2) na základě získaných experimentálních hodnot. I když žádný daný roztok nebude jedinečný, lze získat přiměřenou aproximaci K_S a μ_m.)

Variabilita výsledků

29. Je obecně známo, že získané hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé chemické látky jsou variabilní. Má se za to, že podmínky, za nichž byl kal vypěstován, jakož i podmínky převládající v použité zkoušce (stejně jako v odstavci 5 a v jiných zkouškách), mají velký vliv na výsledné hodnoty. Jedním aspektem této variability se zabýval Grady se svými spolupracovníky (4), který se domníval, že by se pro dvě extrémní podmínky představující hranice fyziologického stavu, jehož může kultura dosáhnout při kinetickém experimentu, měly užívat pojmy „existující“ a „podstatné“. Pokud se tento stav nesmí v průběhu zkoušky měnit, odrážejí hodnoty kinetických parametrů podmínky v prostředí, ze kterého byly mikroorganismy odebrány; tyto hodnoty se nazývají „existující“ nebo aktuálně existující. Na druhé straně, pokud podmínky zkoušky umožňují plný rozvoj systému syntetizujícího proteiny, který umožňuje maximální možnou míru růstu, nazývají se získané kinetické parametry „podstatnými“ a jsou závislé pouze na povaze substrátu a na druzích bakterií v kultuře. Jako vodítko může posloužit fakt, že existující hodnoty se získají udržováním nízkého poměru koncentrace substrátu a příslušných mikroorganismů (S_o/X_o), např. 0,025, a podstatné hodnoty vznikají, když je tento poměr vysoký, např. alespoň 20. V obou případech by se tedy hodnota S_o měla rovnat příslušné hodnotě K_s, polosaturační konstantě, nebo ji převyšovat.

30. Variabilita a další aspekty kinetiky biologického rozkladu byly projednávány na nedávném workshopu SETAC (5). Z těchto vykazovaných a plánovaných studií by měl vyplynout jasnější pohled na kinetiku působící v čistírnách odpadních vod, který umožní lepší interpretaci stávajících údajů a návrh více relevantních podob budoucích zkušebních metod.

LITERATURA:

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

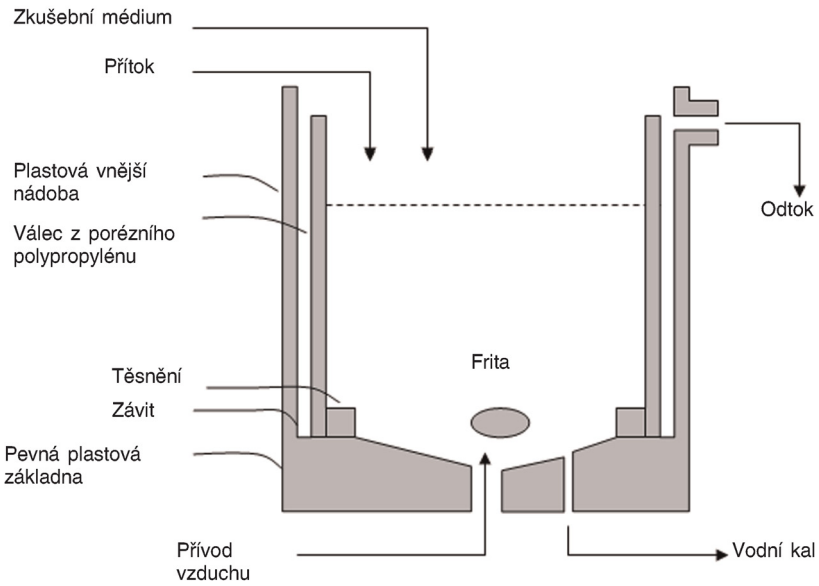
4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Dodatek 6.1

Porézní nádoba s kontrolou doby zdržení kalu



▼M4

Dodatek 6.2

Výpočet kinetických konstant

1. Za předpokladu platnosti kinetiky dle Monoda a s přihlédnutím k hmotnostní bilanci aktivní sušiny kalu a substrátu v aktivačním systému (1) lze vyjádřit ustálený stav následujícími rovnicemi:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

nebo

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kde:

S_1 = koncentrace substrátu v odtoku (v mg/l)

K_S = půlrychlostní (saturační) konstanta, koncentrace, při které $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifická rychlost růstu (d^{-1})

μ_m = maximální hodnota μ_m (d^{-1})

K_d = specifická rozkladná konstanta aktivní sušiny kalu (d^{-1})

θ_S = střední doba zdržení kalu, SRT (d)

Přezkoumání této rovnice vede k následujícím závěrům:

i) Koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku nezávisí na koncentraci zkoušené chemické látky S_0 v přítoku; z tohoto důvodu procento biologického rozkladu kolísá podle koncentrace zkoušené chemické látky S_0 v přítoku.

ii) Jediným technologickým parametrem ovlivňujícím hodnotu S_1 je doba zdržení kalu θ_S.

iii) Pro danou koncentraci zkoušené chemické látky S_0 v přítoku existuje kritická doba zdržení kalu, která je popsána rovnicí:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kde:

θ_{SC} = kritická doba zdržení kalu; při nižší době budou příslušné organismy z čistírny vypláchnuty.

iv) Vzhledem k tomu, že ostatní parametry v rovnici 2) jsou spojeny s kinetikou růstu, bude úroveň substrátu v odtoku pravděpodobně příznivě ovlivněna teplotou a kritické stáří biomasy, tj. doba zdržení kalu potřebná k dosažení určitého stupně rozkladu, se bude s poklesem teploty zvyšovat.

2. Z hmotnostní bilance sušiny kalu v modelu s porézní nádobou a za předpokladu nízké koncentrace sušiny kalu X_2 v odtoku z modelu v porovnání ke koncentraci sušiny kalu X_1 v aerační nádrži je doba zdržení kalu

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

a

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kde:

V = objem aerační nádrže v litrech

X_1 = koncentrace sušiny kalu v aerační nádrži v mg/l

X_2 = koncentrace sušiny kalu v odtoku v mg/l

Q_0 = průtok přítoku v litrech za den

Q_1 = průtok přebytečného kalu v litrech za den.

Takže dobu zdržení kalu je možné řídit přednastaveným průtokem přebytečného kalu Q_1.

Závěry:

3. Hlavním účelem této zkoušky je tedy předpovědět koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku, a tudíž i v recipientu.

4. Kritickou dobu zdržení kalu θ_{SC} lze někdy snadno vyhodnotit vynesením S_1 v závislosti na θ_S, například v křivce 3 na obrázku 1. Pokud tento způsob není možný, lze θ_{SC} vypočítat spolu s přibližnými hodnotami μ_m a K_S vynesením S_1 v závislosti na součinu $S_1 \cdot \theta_S$.

Úpravou rovnice (1) se získá rovnice:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Pokud je hodnota K_d nízká, potom výraz $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ a rovnice [5] se zjednoduší na rovnici:

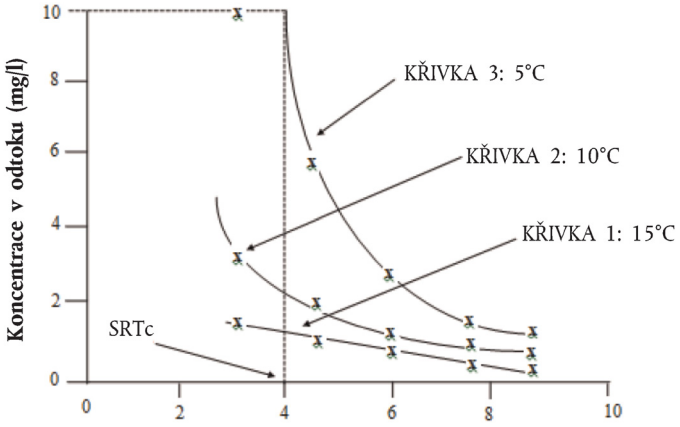
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Vynesením do grafu se získá přímka (viz obrázek 2) se směrnicí $1/\mu_m$ a úsekem K_S/μ_m. Přibližně platí rovněž $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

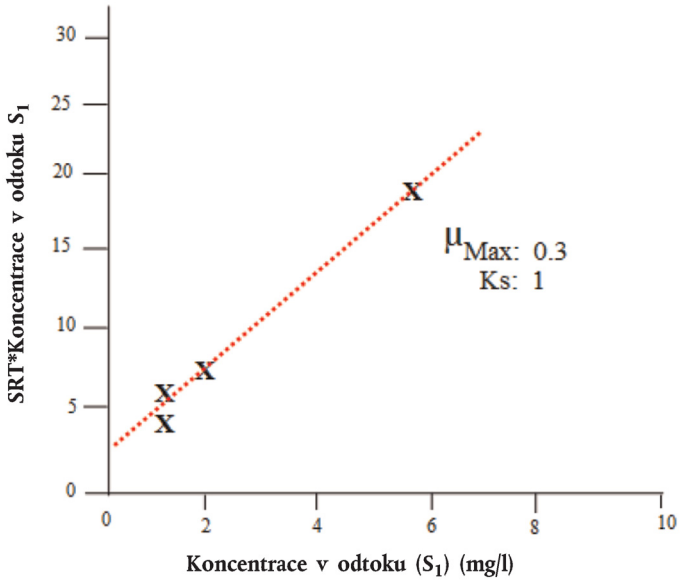
Obrázek 1

Tři teploty; pět dob zdržení kalu



Obrázek 2

Regresní přímka doby zdržení kalu S_1 jako funkce S_1 (T = 5 °C)



Slovníček:

Koncentrace v odtoku:

Křivka:

▼M4

Dodatek 7

ZKOUŠKA PŘI NÍZKÉM ROZMEZÍ KONCENTRACÍ (µg/l)

1. Mnohé chemické látky jsou obvykle přítomny ve vodním prostředí, a to i v odpadních vodách, ve velmi nízkých koncentracích (µg/l). V takových koncentracích pravděpodobně neslouží jako primární substráty zajišťující růst, ale spíše se rozkládají jako „nerůstové“ sekundární substráty souběžně s různými přirozeně se vyskytujícími uhlíkatými látkami. V důsledku toho nelze pro rozklad těchto látek použít model popsaný v dodatku 6. Lze uplatnit celou řadu modelů a za podmínek převažujících v systémech čištění odpadních vod může současně fungovat více těchto modelů. K objasnění tohoto problému bude zapotřebí dalšího rozsáhlého výzkumu.

2. Do té doby se lze řídit postupem uvedeným v hlavním textu (kapitola C.10), avšak pouze pro primární biologickou rozložitelnost pomocí vhodně nízkých koncentrací (< 100 µg/l) a validovaných analytických postupů. Procento biologického rozkladu lze vypočítat (viz odst. 54 zkušební metody) za předpokladu, že jsou zohledněny abiotické procesy (adsorpce, těkavost atd.). Příkladem je studie Nyholma a spolupracovníků (1, 2), která užívá čtyřhodinový cyklus v systému plnění a odběru. Uvedli konstanty pseudoprvního řádu u 5 chemických látek přidávaných do syntetické odpadní vody v koncentraci 5 až 100 0 µg/l. (Pro úplnou biologickou rozložitelnost lze použít zkoušené chemické látky značené izotopem ^{14}C. Popis tohoto postupu přesahuje rámec této zkušební metody, protože dosud neexistují dohodnuté postupy, přestože metoda navrhovaná pro ISO 14592 (3) obsahuje návod na používání látek značených izotopem ^{14}C.

Zkouška SCAS

3. Později byla navržena jednodušší dvoustupňová zkouška; (4, 5, 6); po semikontinuální metodě s aktivovaným kalem (SCAS) jsou provedeny krátkodobé kinetické zkoušky vzorků odebraných z modelů SCAS. Systém SCAS pracuje se známými objemy odtahování kalu (na rozdíl od původní zkušební metody C.12) a přidává se do něj modifikovaná syntetická odpadní voda dle OECD nebo splašková odpadní voda. Syntetická odpadní voda byla upravena (z důvodu změny hodnoty pH a nízké schopnosti usazování kalů) přídavkem fosfátu jako pufru, kvasnicového extraktu, chloridu železitého a solí stopových prvků a její CHSK byla zvýšena přibližně na 750 mg/l zvýšením koncentrace peptonu a masového extraktu. Zařízení byla provozována ve 24hodinovém cyklu: provzdušňování po dobu 23 hodin, odtah kalu, vypuštění supernatantu (z odtoku) s následným přídavkem syntetické odpadní vody a zkoušené chemické látky, a to až do 100 µg/l, (tj. ve zhruba stejné koncentraci jako při krátkodobé zkoušce). Jednou týdně bylo 10 % celkového kalu nahrazeno čerstvým kalem za účelem udržení rovnováhy mikrobiální populace.

4. Změří se koncentrace zkoušené chemické látky na začátku a ke konci provzdušňování a zkouška se provádí až do dosažení konstantního odstranění zkoušené chemické látky, což trvá od jednoho týdne do několika měsíců.

Krátkodobá zkouška

5. Krátkodobá zkouška (např. 8 hodin) se používá k určení kinetické rychlostní konstanty (pseudo) prvního řádu rozkladu zkoušené chemické látky v aktivovaném kalu známého, ale různého původu a historie. Vzorky kalů se v průběhu aklimatizačního experimentu (odstavce 3, 4) odebírají zejména z reaktorů SCAS na konci provzdušňovacího období, kdy je koncentrace organického substrátu nízká. Kal může být pro srovnání odebrán také z paralelního modelu SCAS, který nebyl vystaven zkoušené látce. Směsi kalu a zkoušené chemické látky přidané ve dvou nebo více koncentracích

▼M4

v rozsahu 1–50 μg/l se provzdušní bez přídavku syntetické odpadní vody nebo jiného organického substrátu. Zkoušené chemické látky zbývající v roztoku se stanovují v pravidelných intervalech, např. každou hodinu v závislosti na rozložitelnosti dané chemické látky, ne však déle než po dobu 24 hodin. Vzorky se před provedením příslušné analýzy odstředí.

Výpočty

6. Údaje z modelů SCAS se užívají pro výpočet procenta úbytku zkoušené chemické látky (odstavec 54). Je rovněž možné vypočítat průměrnou rychlostní konstantu K_1 (normalizovanou na koncentraci nerozpuštěných látek) podle vzorce:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kde:

t = doba provzdušňování (23 h),

C_e = koncentrace na konci provzdušňovacího období v μg/l,

C_i = koncentrace na počátku provzdušňování v μg/l,

SS = koncentrace tuhých látek v aktivovaném kalu v g/l).

7. V krátkodobé zkoušce se do grafu vynese zbývající koncentrace log % v závislosti na čase a sklon počáteční části křivky (10–50 % rozklad) odpovídá K_1, konstantě (pseudo) prvního řádu. Tato konstanta se normalizuje s ohledem na koncentraci sušiny kalu tak, že se sklon křivky vydělí koncentrací sušiny kalu. Uvedený výsledek musí rovněž obsahovat podrobnosti o počátečních koncentracích zkoušené chemické látky a nerozpuštěných látek, době zdržení kalu, množství a zdroji zapravovaného kalu a podrobnosti případné adaptace za přítomnosti zkoušené látky.

Variabilita výsledků

8. Variabilita a další aspekty kinetiky biologického rozkladu byly projednávány na nedávném workshopu SETAC (7). Z těchto vykazovaných a plánovaných studií by měl vyplynout jasnější pohled na kinetiku působící v čistírnách odpadních vod, který umožní lepší interpretaci stávajících údajů a navržení více relevantních podob budoucích zkušebních metod.

LITERATURA:

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilmy

ÚVOD

1. Simulační zkoušky se zpravidla užívají u látek, které nevyhověly screeningové zkoušce na snadnou biologickou rozložitelnost (kapitola C.4 A až F této přílohy (9)), ale vyhověly zkoušce biologické rozložitelnosti. Výjimečně se simulační zkoušky použijí také pro chemické látky, o kterých je potřeba zjistit více informací, zejména pro velkotonážní chemické látky, a zpravidla se použije zkouška s aktivovaným kalem (C.10 A). V některých případech je však nutné získat specifické informace týkající se chování chemické látky při metodách čištění odpadních vod využívajících biofilmy; konkrétně se jedná o biologické perkolační nebo skrápěné filtry, rotační ponořené filtry a reaktory se vznášeným ložem. Pro splnění této potřeby byla vyvinuta různá zařízení.

2. Gerike *a spolupracovníci* (1) používali velké pilotní skrápěné filtry v režimu spřažení. Tyto filtry zabíraly mnoho místa a vyžadovaly relativně velké objemy odpadní vody nebo syntetické odpadní vody. Truesdale *a spolupracovníci* (2) popsali menší filtry (o průměru 6 stop × 6 palců), ve kterých se používala přírodní odpadní voda bez příměsi povrchově aktivních látek, avšak i ty vyžadovaly relativně velké objemy. K vytvoření „zralého“ biofilmu bylo zapotřebí až 14 týdnů a aklimatizace proběhla až po dalších 4–8 týdnech po prvním zavedení zkušební povrchově aktivní látky.

3. Baumann *a spolupracovníci* (3) vyvinuli mnohem menší filtr, který používal polyesterové „rouno“ předem namočené v aktivovaném kalu jako inertní médium na podporu růstu biofilmu. Zkoušená chemická látka byla užita jako jediný zdroj uhlíku a biologická rozložitelnost byla hodnocena na základě měření rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v přítoku a odtoku a množství CO_2 ve výstupním plynu.

4. Zcela jiný přístup použili Gloyna *a spolupracovníci* (4) kteří vynalezli rotační trubkový reaktor. Na vnitřním povrchu otáčející se trubky se vytvořil biofilm na známé ploše povrchu působením přítoku zavedeného do horního konce trubky skloněné pod malým úhlem k vodorovné rovině. Tento reaktor byl použit ke studiu biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek (5) i ke zkoumání optimální tloušťky biofilmu a difuze filmem (6). Uvedení posledně jmenovaní autoři tento reaktor dále vyvíjeli, včetně úpravy umožňující stanovit CO_2 ve výstupním plynu.

5. Rotační trubkový reaktor byl přijat stálým výborem analytiků (*Standing Committee of Analysts*) (UK) jako standardní metoda stanovení jak biologické rozložitelnosti chemických látek (7), tak upravitelnosti a toxicity odpadních vod (8). Zde popsaná metoda je výhodná pro svou jednoduchost, kompaktnost, reprodukovatelnost a potřebu relativně malých objemů organického média.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Syntetická odpadní voda nebo splašková odpadní voda a zkoušená chemická látka se ve směsi nebo samostatně aplikují na vnitřní povrch pomalu rotující šikmé trubky. Na tomto vnitřním povrchu se vytvoří vrstva mikroorganismů podobných mikroorganismům, které se vyskytují na médiích biologického filtru. Podmínky pro provoz reaktoru jsou zvoleny tak, aby umožňovaly odpovídající odstranění organických látek a v případě potřeby i oxidaci amonia.

▼M4

7. Odpadní vody z trubky se shromažďují a před analýzou na rozpuštěný organický uhlík (DOC) a/nebo zkoušenou látku prostřednictvím specifické metody se buď usazují, a/nebo filtrují. Paralelně se za stejných podmínek provozují kontrolní zařízení bez zkoušené chemické látky za účelem srovnání. Předpokládá se, že rozdíl mezi koncentrací DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu pochází ze zkoušené chemické látky nebo jejích organických metabolitů. Tento rozdíl se porovná s koncentrací přidané zkoušené chemické látky (jako DOC) s cílem vypočítat odstranění zkoušené chemické látky.

8. Biologický rozklad lze zpravidla rozpoznat podle biologické adsorpce pečlivým prozkoumáním časové křivky odstranění. Potvrzení lze obvykle získat pomocí zkoušky snadné rozložitelnosti (spotřeba kyslíku nebo produkce oxidu uhličitého) s použitím aklimatizovaného inokula odebraného na konci zkoušky z reaktorů, do nichž je vpouštěna zkoušená chemická látka.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

9. Pro správnou interpretaci výsledků by měla být známa čistota zkoušené chemické látky, její rozpustnost ve vodě, těkavost a adsorpční vlastnosti.

10. U těkavých a těžko rozpustných chemických látek nelze zpravidla zkoušku provést, pokud nebudou přijata zvláštní opatření (viz dodatek 5 ke kapitole C.10 A). Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. teoretické spotřeby kyslíku (TSK) nebo (DOC), je rovněž nutno znát chemickou strukturu nebo alespoň empirický vzorec.

11. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky vůči mikroorganismům (viz dodatek 4 ke kapitole C.10 A); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

12. Původně musel primární biologický rozklad povrchově aktivních látek před uvedením chemické látky na trh dosáhnout 80 % nebo více. Pokud není dosaženo hodnoty 80 %, lze použít tuto simulační (potvrzující) zkoušku a danou povrchově aktivní látku uvést na trh pouze za předpokladu odstranění více než 90 % dané chemické látky. Obecně se chemické látky neposuzují z hlediska vyhověla/nevyhověla a při přibližných výpočtech pravděpodobné koncentrace v životním prostředí, které se užívají při posuzování rizik plynoucích z chemických látek, lze použít získané hodnoty procenta úbytku. V řadě studií čistých chemických látek bylo zjištěno procento úbytku DOC > 90 % u více než tří čtvrtin a > 80 % u více než 90 % chemických látek, které nevykazují žádný významný stupeň biologické rozložitelnosti.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

13. Aby bylo zajištěno správné provedení experimentálního postupu, je vhodné provádět občasné zkoušky látek, jejichž chování je známé. Tyto chemické látky zahrnují kyselinu adipovou, 2-fenyl fenol, 1-naftol, kyselinu difenovou a 1-naftoovou kyselinu.

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

14. Laboratoř v UK zjistila, že relativní směrodatná odchylka v rámci zkoušek činí 3,5 % a mezi jednotlivými testy 5 % (7).

▼M4

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

Rotační trubkové reaktory

15. Zařízení (viz obr. 1 a 2 v dodatku 8) se skládá ze svazku akrylových trubek o délce 30,5 cm a vnitřním průměru 5 cm; trubky spočívají na kolech s gumovými pneumatikami zasazených do kovového nosného rámu. Každá trubka má vnější výčnělek o hloubce přibližně 0,5 cm, který ji drží na kolech; její vnitřní povrch je zdrsněn hrubou drátěnkou a na horním (přítočném) konci má 0,5 cm hluboký vnitřní výčnělek, který umožňuje udržení kapaliny. Trubky jsou skloněny pod úhlem přibližně jednoho stupně k vodorovné rovině, aby bylo dosaženo požadované doby kontaktu při aplikaci zkušebního média do čisté trubky. Kola opatřená gumovými pneumatikami se otáčejí pomocí pomalého motoru s proměnnými otáčkami. Teplota trubek je řízena instalací do místnosti s konstantní teplotou.

16. Uzavřením každého trubkového reaktoru do poněkud větší zkrácené trubky a zajištěním plynotěsnosti spojů lze plynný CO_2 na výstupu sbírat do zásaditého roztoku za účelem následného měření (6).

17. V zásobníku o objemu 20 l (A) (viz obrázek 2) je uložena 24hodinová zásoba organického média pro každou trubku, případně s přidáním zkoušené chemické látky. Pokud je to nutné, lze roztok zkoušené chemické látky dávkovat odděleně. V dolní části každého zásobníku je výstup, který je připojen pomocí vhodného potrubí, např. ze silikonového kaučuku, přes peristaltické čerpadlo (B) ke skleněné nebo akrylové výstupní trubici, která v délce 2–4 cm ústí do vyššího (přítočného) konce nakloněné trubky (C). Odtok se nechá odkapat ze spodního konce nakloněné trubky a je shromažďován v jiném zásobníku (D). Odtok se před analýzou usazuje nebo filtruje.

Filtrační zařízení – odstředivka

18. Přístroj pro membránovou filtraci s filtry vhodné velikosti pórů (jmenovitý průměr pórů 0,45 μm), které co nejméně adsorbují organické chemické látky nebo uvolňují organický uhlík. Pokud použité filtry uvolňují organický uhlík, promyjí se pečlivě horkou vodou, aby byl odstraněn vyluhovatelný organický uhlík. Lze použít rovněž odstředivku vhodnou pro odstřeďování při odstředivém zrychlení 40 000 m/s^2.

19. Analyzátor pro stanovení:

— DOC/celkového organického uhlíku (TOC) nebo chemické spotřeby kyslíku (CHSK),

— podle potřeby specifické chemické analýzy (HPLC, GC atd.),

— pH, teploty, kyselosti, zásaditosti,

— jestliže systém pracuje s nitrifikací, pak vybavení pro stanovení amoniakálního, dusitanového a dusičnanového dusíku.

Voda

20. Vodovodní voda s koncentrací DOC menší než 3 mg/l.

21. Destilovaná nebo deionizovaná voda s koncentrací DOC menší než 2 mg/l.

▼M4

Organické médium

22. Jako organické médium je přípustná syntetická odpadní voda, splašková odpadní voda nebo jejich směs. Bylo prokázáno, že použití samotné splaškové odpadní vody často vede k většímu procentu odstranění DOC (v zařízeních s aktivovaným kalem), a dokonce umožňuje odstranění některých chemických látek, které se při užití syntetické odpadní vody dle OECD biologicky nerozloží. Proto se doporučuje použití splaškové odpadní vody. Koncentrace DOC (nebo CHSK) se stanovuje v každé nové šarži organického média. Měla by být známa kyselost nebo zásaditost organického média. Organické médium může vyžadovat přidání vhodného pufru (hydrogenuhličitan sodný nebo dihydrogenfosforečnan draselný) v případě, že má nízkou kyselost nebo zásaditost, s cílem udržet pH v reaktoru v průběhu zkoušky na hodnotě přibližně 7,5 ± 0,5. V každém jednotlivém případě je nutno rozhodnout o množství pufru, které má být přidáno, a době jeho přidání.

Syntetická odpadní voda

23. V 1 litru vodovodní vody se rozpustí 160 mg peptonu, 110 mg masového výtažku, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) a 2 mg heptahydrátu síranu hořečnatého ($MgSO_4.7H_2O$). Tato syntetická odpadní voda (OECD médium) je modelovým příkladem a vykazuje průměrnou koncentraci DOC v přítoku přibližně 100 mg/l. Další možností je použít jiná složení o přibližně stejné koncentraci DOC, která se více blíží skutečnému složení odpadní vody. Tuto syntetickou odpadní vodu lze připravit v destilované vodě v koncentrované podobě a uchovávat při teplotě asi 1 °C po dobu až jednoho týdne. V případě potřeby lze zředit vodovodní vodou. (Toto médium je nevyhovující, např. koncentrace dusíku je velmi vysoká, obsah uhlíku je relativně nízký, avšak nebyla navržena žádná lepší varianta kromě přidání dalšího fosfátu jako pufru a více peptonu).

Splašková odpadní voda

24. Použije se čerstvá usazená odpadní voda odebíraná každý den z čistírny, která zpracovává převážně splaškové domovní odpadní vody. Odebírá se primární sedimentací z přepadu čistírny nebo z přítoku do čistírny pracující s aktivovaným kalem a musí z ní být z větší části odstraněny hrubé částice. Odpadní voda může být uchovávána po několik dní přibližně při 4 °C, pokud se prokáže, že hodnota DOC (nebo CHSK) se během uchovávání výrazně nesníží (tj. o více než 20 %). K zamezení poruchového provozu systému se před použitím upraví DOC (nebo CHSK) u každé nové šarže na příslušnou stálou koncentraci, např. zředěním vodovodní vodou.

Mazivo

25. Na mazání válečků peristaltických čerpadel lze použít glycerol nebo olivový olej; obojí je vhodné pro použití na potrubí ze silikonové pryže.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

26. U chemických látek s dostatečnou rozpustností se připraví zásobní roztok zkoušené chemické látky vhodné koncentrace (např. 1 až 5 g/l) v deionizované vodě nebo v minerální složce syntetické odpadní vody. U nerozpustných látek viz dodatek 5 v kapitole C.10-A. Tato metoda není vhodná pro těkavé chemické látky bez úpravy trubkových reaktorů (odstavec 16). V zásobním roztoku se stanoví DOC a TOC a měření se u každé nové šarže zopakuje. Jestliže je rozdíl mezi DOC a TOC větší než 20 %, ověří se rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě. DOC nebo koncentrace zkoušené chemické látky stanovená v zásobním roztoku specifickou analýzou se porovná se jmenovitou hodnotou, aby se zjistilo, zda

▼M4

analytická výtěžnost je dostatečná (obvykle lze očekávat > 90 %). Zhodnotí se, zvláště u disperzí, zda DOC může být použit jako analytický ukazatel nebo zda lze použít jen analytickou techniku specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku. Vzorky s disperzí je nutné odstředit. V každé nové šarži se stanoví hodnoty DOC, CHSK nebo zkoušené chemické látky pomocí specifické analýzy.

27. V zásobním roztoku se stanoví hodnota pH. Extrémní hodnoty indikují, že přidání chemické látky může ovlivňovat hodnotu pH aktivovaného kalu ve zkušebním systému. V takovém případě se zásobní roztok neutralizuje na hodnotu pH 7 ± 0,5 malým objemem anorganické kyseliny nebo zásady. Nesmí však dojít k vysrážení zkoušené látky.

POSTUP

Příprava organického média pro dávkování

28. Je nutné zajistit důkladné vyčištění sběrných nádob na přítok a na odtok a trubek vedoucích z nádob na přítok a do nádob na odtok, aby se zabránilo růstu mikroorganismů na počátku zkoušky i v celém jejím průběhu

29. Syntetická odpadní voda (bod 23) se připravuje každý den čerstvá buď ze sušiny kalu, nebo z koncentrovaného zásobního roztoku odpovídajícím zředěním vodovodní vodou. Požadované množství se odměří ve válci a přidá se do čisté nádoby na přítok. V případě potřeby se do syntetické odpadní vody před zředěním rovněž přidá požadované množství zásobního roztoku zkoušené chemické látky nebo referenční chemické látky. Pokud je to výhodnější nebo nutné, aby se zabránilo ztrátám zkoušené chemické látky, připraví se odděleně zředěný roztok zkoušené chemické látky v oddělené nádrži a přidá se do nakloněných trubek prostřednictvím jiného dávkovacího čerpadla.

30. Lze rovněž (a přednostně) použít usazenou splaškovou odpadní vodu (odstavec 24), která je získávána čerstvě, pokud možno každý den.

Provoz rotačních trubkových reaktorů

31. Pro posouzení jedné zkoušené chemické látky jsou zapotřebí dva identické trubkové reaktory, které se sestaví v místnosti s konstantní teplotou, zpravidla 22 ± 2 °C.

32. Peristaltická čerpadla se upraví tak, aby dávkovala do nakloněných trubek, které se otáčejí rychlostí 18 ± 2 ot/min, 250 ± 25 ml/h organického média (bez zkoušené chemické látky). Na trubky čerpadel se na počátku nanese mazivo (bod 25) a v průběhu zkoušky se bude pravidelně nanášet dále s cílem zajistit řádné fungování a delší životnost trubek.

33. Úhel sklonu trubek se nastaví vzhledem k horizontální rovině tak, aby se zajistila doba zdržení 125 ± 12,5 s přívodu v čisté trubce. Retenční čas se odhadne přidáním nebiologického markeru (např. NaCl, inertní barvivo) do přiváděného média; za průměrnou dobu zdržení se považuje čas potřebný k dosažení maximální koncentrace v odtoku (je-li dosaženo maximální tloušťky filmu, může se retenční čas zvýšit až na přibližně 30 min.).

34. Bylo zjištěno, že při tomto průtoku, rychlosti a čase dochází k adekvátnímu odstranění (> 80 %) DOC (nebo CHSK) a vzniku nitrifikovaného odtoku. Pokud je odstranění nedostatečné nebo v případě, že je třeba simulovat výkon konkrétní čistírny odpadních vod, bude zapotřebí průtok změnit. Ve druhém z těchto případů je třeba upravit rychlost dávkování organického média, dokud výkon reaktoru nedosáhne stejného výkonu jako čistírna odpadních vod.

▼M4

Inokulace

35. Při použití syntetické odpadní vody může být pro zahájení růstu mikroorganismů dostatečná inokulace vzdušnou cestou, v jiných případech se však do přiváděného média po dobu 3 dnů přidává 1 ml/l odsazené odpadní vody.

Měření

36. V pravidelných intervalech se kontroluje, zda se rychlost dávkování a rychlost rotace pohybují v požadovaných mezích. Měří se rovněž pH v odtoku, a to zejména tehdy, pokud se předpokládá nitrifikace.

Odběr vzorků a analýza

37. Způsob, vzor a četnost odběru vzorků jsou vybrány tak, aby vyhovovaly účelu zkoušky. Odeberou se například jednorázové (nebo prosté) vzorky přítoku a odtoku, nebo se vzorky shromažďují po delší dobu, např. 3–6 hodin. V prvním období bez zkoušené chemické látky se odběr vzorků provádí dvakrát týdně. Vzorky se filtrují přes membrány nebo pomocí odstředivky při odstředivém zrychlení přibližně 40 000 m/s^2 přibližně 15 min. (odstavec 18). Před membránovou filtrací může být nutné nechat vzorky usadit a/nebo je přefiltrovat přes hrubý filtr. Provedou se nejméně dvě souběžná stanovení DOC (nebo CHSK) a v případě potřeby i BSK, amoniakálního a dusičnanového/dusitanového dusíku.

38. Všechny analýzy by měly být provedeny co nejdříve po odběru a přípravě vzorků. Je-li třeba analýzy odložit, musí být vzorky uchovávány přibližně při 4 °C v temnu, ve zcela naplněných a dobře uzavřených lahvičkách. Je-li zapotřebí uchovat vzorky déle než 48 h, konzervují se zmrazením, okyselením nebo přidáním vhodné toxické chemické látky (např. přídavkem 20 ml/l roztoku chloridu rtuťnatého koncentrace 10 g/l). Ověří se, zda použitý způsob konzervace neovlivní výsledky analýzy.

Rozběhová fáze

39. V této fázi povrchový biofilm roste za účelem dosažení optimální tloušťky; tato fáze trvá obvykle asi 2 týdny, avšak neměla by být delší než šest týdnů. Odstranění (bod 44), DOC (nebo CHSK) se zvyšuje a dosahuje hodnoty fáze prodlevy. Když bylo dosaženo fáze prodlevy při obdobné hodnotě v obou trubkách, jedna z nich se vybere jako kontrolní po celý zbytek zkoušky, v jejímž průběhu by měla být její účinnost konzistentní.

Přidání zkoušené chemické látky

40. V této fázi se zkoušená látka přidá do druhého reaktoru v požadované koncentraci, obvykle 10–20 mg C/l. Do kontrolního reaktoru je i nadále čerpáno pouze organické médium.

Období aklimatizace

41. I nadále se dvakrát týdně provádějí analýzy na DOC (nebo CHSK), a pokud je potřeba posoudit primární biologickou rozložitelnost, změří se také koncentrace zkoušené chemické látky specifickou analýzou. Po prvním přídavku zkoušené chemické látky bývá adaptace dosaženo po 1 týdnu až 6 týdnech provozu (za zvláštních podmínek i po delší době). Když procento úbytku (odstavce 43–45), dosáhne maximální hodnoty, získá se 12–15 platných hodnot ve fázi prodlevy po dobu přibližně 3 týdnů za účelem vyhodnocení průměrného procenta úbytku. Zkouška se považuje za ukončenou, jakmile bylo dosaženo dostatečného stupně odstranění. Doba zkoušky po prvním přidání zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit 12 týdnů.

▼M4

Odlučování filmu

42. Náhlé odstranění velkého množství přebytečného filmu z trubek neboli odlučování probíhá v relativně pravidelných intervalech. Aby bylo zajištěno, že nebude ovlivněna srovnatelnost výsledků, je třeba při zkoušce nechat proběhnout alespoň dva kompletní cykly růstu a odlučování.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

43. Stupeň odstranění DOC (nebo CHSK) zkoušené chemické látky v procentech se pro každý časový odhad vypočte podle rovnice:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

kde:

D_t = stupeň odstranění DOC (nebo CHSK) v čase t vyjádřený v procentech,

Cs = koncentrace DOC (nebo CHSK) zkoušené chemické látky v přítoku, přednostně odhadnutá z koncentrace zásobního roztoku a přidaného objemu zkoušené chemické látky v mg/l,

E = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t,

Eo = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku z kontrolního modelu v mg/l v čase t.

Výpočet se opakuje pro referenční chemické látky, pokud jsou předmětem zkoušky.

Výkon kontrolního reaktoru

44. Stupeň (D_B) odstranění DOC (nebo CHSK) organického média v kontrolních reaktorech je užitečnou informací k posouzení biodegradační aktivity biofilmu během zkoušky. Stupeň odstranění organického média se vypočte podle rovnice:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

kde:

Cm = koncentrace DOC nebo CHSK organického média v přítoku do kontrolního modelu v mg/l.

45. Pokud je měřen stupeň odstranění zkoušené chemické látky (D_{ST}) stanovený specifickou analytickou metodou při každém hodnocení v čase, vypočte se podle rovnice:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

kde:

Si = změřená nebo přednostně odhadnutá koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku do zkušebního modelu v mg/l,

Se = změřená koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t.

▼M4

Pokud je na základě této analytické metody stanovena pozitivní hodnota neexponované odpadní vody odpovídající S_c v mg/l, vypočte se úbytek v procentech (D_{SC}) podle rovnice:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Vyjadřování výsledků zkoušky

46. Do grafu se vynese stupeň odstranění D_t a D_{ST} (nebo D_{SC}) vyjádřený v procentech, pokud je k dispozici, v závislosti na čase (viz dodatek 2 v kapitole C.10-A). Vypočte se průměrná hodnota (zaokrouhlená na nejbližší celé číslo) a standardní odchylka 12–15 hodnot pro D_T (a pro $D_{ST,}$ jsou-li k dispozici) získaných ve fázi prodlevy a vyjádřených stupněm odstranění zkoušené chemické látky v procentech. Z tvaru křivky odstranitelnosti lze vyvodit některé závěry o procesech odstranění.

Adsorpce

47. Je-li hned na počátku zkoušky pozorován vysoký stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky, je zkoušená látka pravděpodobně odstraňována adsorpcí na biofilmu. To může být ověřitelné určením adsorbované zkoušené chemické látky na sušině odloučené z filmu. Není obvyklé, aby stupeň odstranění DOC zůstával vysoký v celém průběhu zkoušky; vysoký stupeň odstranění je zpravidla pozorován na počátku zkoušky, avšak pak postupně klesá na rovnovážnou hodnotu. Pokud by ale adsorbovaná zkoušená látka byla schopna způsobit aklimatizaci populace mikroorganismů, stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky by následně vzrostl a ve fázi prodlevy dosáhl vysoké hodnoty.

Lagová fáze

48. Obdobně jako u statických metod i při řadě screeningových zkoušek musí u řady zkoušených chemických látek proběhnout lagová fáze dříve, než dojde k biologickému rozkladu. V lagové fázi dochází k aklimatizaci nebo adaptaci rozkládajících se baktérií, přičemž nedochází téměř k žádnému úbytku zkoušené chemické látky; následně dochází k počátečnímu růstu těchto bakterií. Tato fáze končí a fáze rozkladu konvenčně začíná po úbytku přibližně 10 % počátečního množství zkoušené chemické látky (po započítání případné adsorpce). Lagová fáze je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Fáze prodlevy

49. Fáze prodlevy křivky odstranitelnosti při kontinuální zkoušce je definována jako fáze, v níž dochází k maximálnímu rozkladu. Tato fáze musí trvat nejméně 3 týdny a musí z ní vzejít přibližně 12–15 změřených platných hodnot.

Průměrná hodnota stupně odstranění zkoušené chemické látky

50. Průměrná hodnota se vypočte z hodnot odstranění D_t (a D_{st}, pokud je k dispozici) zkoušené chemické látky během fáze prodlevy. Po zaokrouhlení na nejbližší celé číslo (1 %) získáme stupeň odstranění zkoušené chemické látky. Doporučuje se rovněž vypočítat 95 % konfidenční interval této průměrné hodnoty. Podobným způsobem se vypočte průměrná hodnota stupně (D_B) odstranění organického média v kontrolní nádobě.

▼M4

Indikace biologické rozložitelnosti

51. Jestliže se zkoušená látka výrazně neadsorbuje na biofilmu a křivka odstranitelnosti vykazuje typický průběh biologického rozkladu s lagovou fází, fází rozkladu a fází prodlevy (odstavce 48, 49), lze bezpečně přisoudit změřené odstranění zkoušené chemické látky jejímu biologickému rozkladu. Dojde-li na počátku zkoušky k velkému odstranění, nemůže tato simulační zkouška rozlišit biologické a abiotické eliminační procesy. V takovém případě a také v jiných případech, kdy jsou pochybnosti o biologické rozložitelnosti (např. jestliže dochází ke stripování), se zjišťuje adsorpce zkoušené chemické látky na vzorcích filmu nebo se provedou další statické (screeningové) zkoušky biologické rozložitelnosti založené na ukazatelích jednoznačně indikujících biologické procesy, jako je metoda stanovení spotřebou kyslíku (kapitola C.4 této přílohy D, E a F) (9) nebo zkouška, která měří produkci CO_2 (viz kapitola C.4-C této přílohy nebo metoda Headspace) (10); jako inokulum se použije adaptovaný biofilm z příslušného reaktoru.

52. Pokud bylo změřeno odstraňování DOC a odstraňování konkrétní chemické látky, signalizují významné procentuální rozdíly (v případě první hodnoty jsou nižší než druhé) v odstranění látek přítomnost organických meziproduktů v odtoku, které mohou být obtížněji rozložitelné; ty je nutno prozkoumat.

Platnost výsledků zkoušky

53. Zkouška se považuje za platnou, jestliže je v kontrolním modelu stupeň biologického rozkladu (D_B) podle DOC (nebo CHSK) po 2 týdnech větší než 80 % a nebyly pozorovány žádné neobvyklé jevy.

54. Pokud byla předmětem zkoušky snadno biologicky rozložitelná (referenční) látka, měl by být stupeň biologického rozkladu > 90 % a rozdíl mezi duplicitními hodnotami by neměl být větší než 5 %. Pokud nebyla tato dvě kritéria splněna, je třeba přezkoumat experimentální postupy a/nebo získat splaškovou odpadní vodu z jiného zdroje.

55. Obdobně by se rozdíly mezi hodnotami biologického rozkladu z duplicitních modelů (pokud byly použity) pracujících se zkoušenou chemickou látkou neměly lišit o více než 5 %. Pokud není toto kritérium splněno, ale míra úbytku je vysoká, pokračuje se v analýze po dobu dalších tří týdnů. Pokud je míra úbytku nízká, přezkoumají se inhibiční účinky zkoušené chemické látky, pokud nejsou známy, a zkouška se opakuje s nižší koncentrací zkoušené chemické látky, pokud je to možné.

Protokol o zkoušce

56. V protokolu o zkoušce musí být uvedeny tyto údaje:

Zkoušená látka:

— údaje nutné k identifikaci,

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti.

Zkušební podmínky:

— jakékoli modifikace zkušebního systému zejména v případě, že jsou zkoušce podrobeny nerozpustné nebo těkavé chemické látky,

— typ organického média,

— podíl a charakter průmyslových odpadů obsažených v odpadní vodě, jsou-li užívány a jsou-li známy,

— metoda inokulace,

▼M4

— obsah – DOC (rozpuštěného organického uhlíku) a TOC (celkového organického uhlíku) v zásobním roztoku zkoušené chemické látky, způsob přípravy, jedná-li se o suspenzi, použitá (použité) zkušební koncentrace, případné odůvodnění, pokud se obsah DOC pohybuje mimo rozmezí 10–20 mg/l, metoda přidání, datum prvního přidání, veškeré změny koncentrace,

— průměrná hydraulická doba zdržení (bez nárůstu), rychlost otáčení trubky; pokud možno přibližný úhel sklonu,

— podrobnosti o odlučování, čas a intenzita,

— zkušební teplota a rozsah,

— použité analytické metody.

Výsledky zkoušky:

— všechny změřené údaje (DOC, CHSK, specifické analýzy, hodnota pH, teplota a dusíkaté látky, pokud je to relevantní),

— všechny vypočtené hodnoty D_t (nebo D_{tc}), D_B, D_s v tabelované formě a křivky odstranitelnosti,

— údaje o lagové fázi a fázi prodlevy, doba trvání zkoušky, stupeň odstranění zkoušené chemické látky, referenční chemické látky (pokud byla předmětem zkoušky) a stupeň odstranění organického média (v kontrolním modelu) společně se statistickými informacemi a vyjádřením k biologické rozložitelnosti zkoušené chemické látky a platnosti zkoušky,

— diskuse o výsledcích.

LITERATURA:

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné" biologické rozložitelnosti A–F.

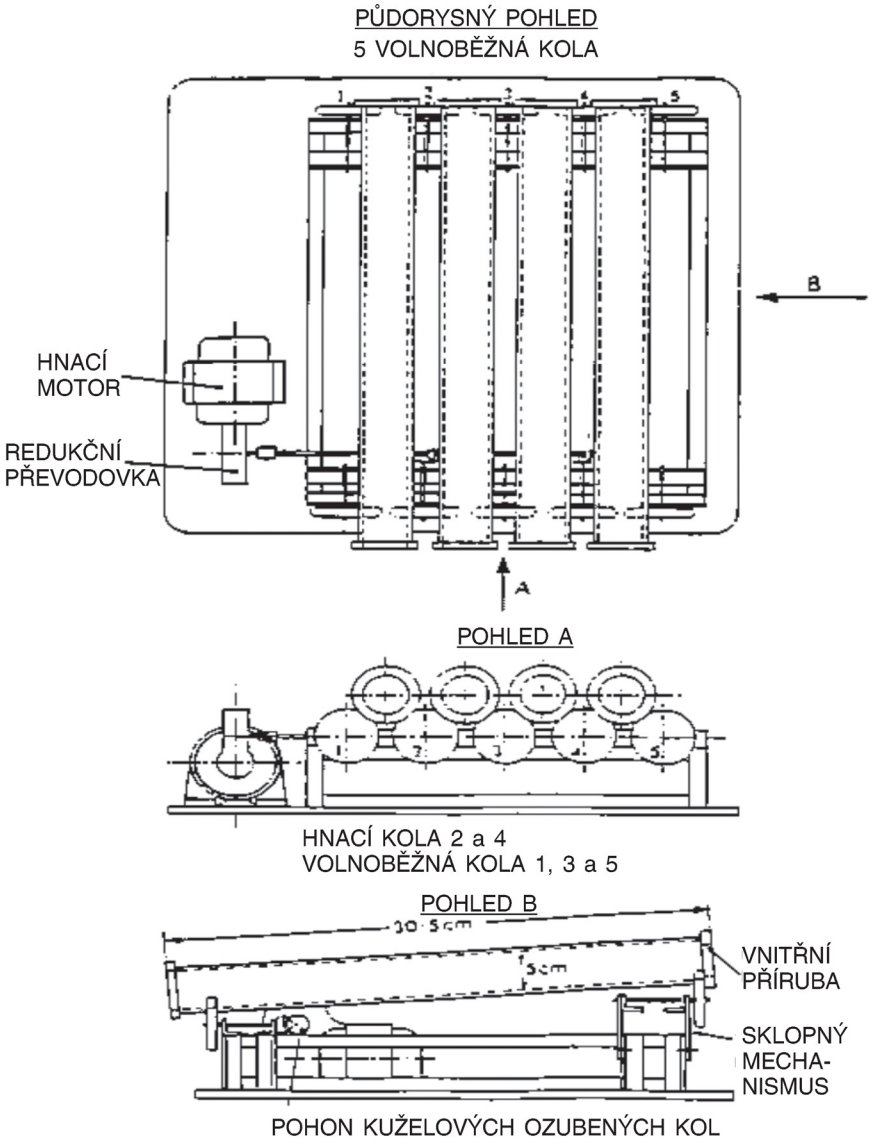
10) ISO 14593 (1998). Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách.

▼M4

Dodatek 8

Obrázek 1

Rotační trubky



Slovníček

Půdorysný pohled

Pohled A/B

Hnací kola

Volnoběžná kola

Hnací motor

Redukční převodovka

Vnitřní příruba

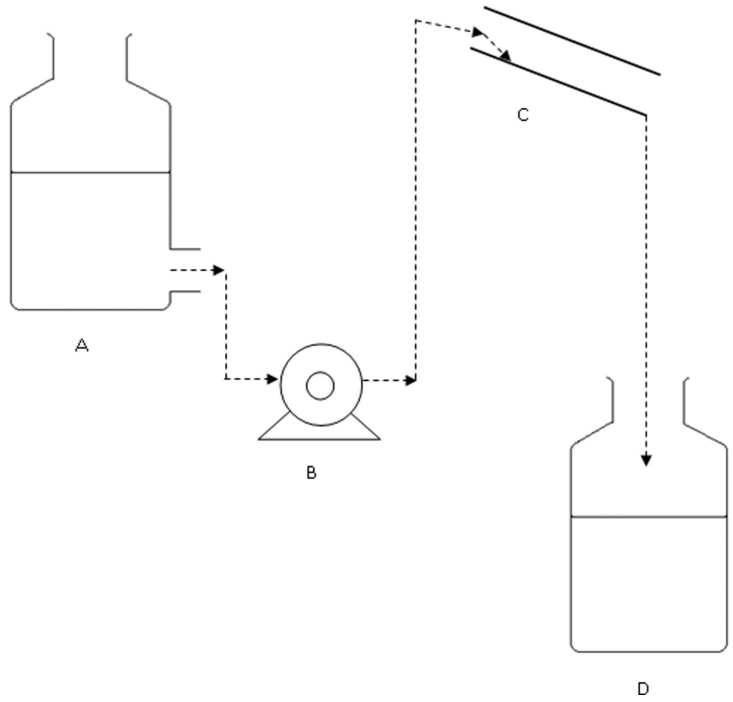
Sklopný mechanismus

Pohon kuželových ozubených kol

▼**M4**

Obrázek 2

Graf toku



A: zásobník

B: peristaltické čerpadlo

C: rotační trubka

D: zásobník na výtok

DEFINICE:

Zkoušená látka: jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

Chemické látky: „Je třeba poznamenat, že pojem ‚chemická látka' je obecně užíván v dohodách UNCED i v navazujících dokumentech a zahrnuje látky, výrobky, směsi, přípravky nebo jakékoliv jiné termíny, které lze použít ve stávajících systémech pro označení pokrytí."

▼B

C.11. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

ZKOUŠKA NA INHIBICI DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU

1. METODA

1.1. ÚVOD

Popsanou metodou se posuzuje vliv zkoušené látky na mikroorganismy měřením rychlosti jejich dýchání za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky.

Účelem této metody je poskytnout rychlou screeningovou metodu, kterou lze určit látky, které mohou nepříznivě ovlivnit aerobní mikrobiální čistírny vod, a odhadnout vhodné koncentrace zkoušených látek, které nejsou inhibující a které je možno použít ve zkouškách biologické rozložitelnosti.

Hlavní zkoušce může předcházet orientační zkouška. Poskytne informace o rozsahu koncentrací, které je možné použít v hlavní zkoušce.

Do plánu zkoušky se zařadí dvě kontroly, jedna na začátku a druhá na konci řady pokusů. Každá dávka aktivovaného kalu se také kontroluje pomocí referenční látky.

Tato metoda je nejsnadněji použitelná pro látky, které díky své rozpustnosti a nízké těkavosti zůstávají většinou ve vodě.

U látek s nízkou rozpustností v médiích používaných ve zkoušce může být nemožné stanovit EC_{50}.

Pokud má zkoušená látka sklon k rozkladu oxidační fosforylací, mohou výsledky založené na absorpci kyslíku vést k nesprávným závěrům.

Před provedením zkoušky je užitečné ověřit tyto informace:

— rozpustnost látky ve vodě,

— tlak par,

— strukturní vzorec,

— čistota zkoušené látky.

Doporučení

Aktivovaný kal může obsahovat potenciálně patogenní organismy a je třeba s ním zacházet opatrně.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Respirační rychlost je spotřeba kyslíku mikroorganismy odpadních vod v aerobním kalu obecně vyjádřená v mg O_2 na 1 mg kalu za hodinu.

▼B

Pro výpočet inhibičního účinku zkoušené látky při určité koncentraci se respirační rychlost vyjadřuje v procentech průměrné hodnoty dvou kontrolních respiračních rychlostí:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 \; = \; \% \text{ inhibice}$$

kde:

R_s = rychlost spotřeby kyslíku při použité koncentraci zkoušené látky,

R_{c1} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrole 1,

R_{c2} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrole 2,

EC_{50} je v této zkoušce koncentrace zkoušené látky, při které činí respirační rychlost 50 % hodnoty vycházející z kontroly za podmínek popsaných v této metodě.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Jako referenční látka se doporučuje známý inhibitor dýchání 3,5-dichlorfenol, kterým by mělo být prostřednictvím ověření EC_{50} u každé dávky aktivovaného kalu zkontrolováno, že kal není mimořádně citlivý.

1.4. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Respirační rychlost aktivovaného kalu vyživovaného standardním množstvím syntetické odpadní vody se měří po době kontaktu 30 minut nebo 3 hodiny, popřípadě v obou časech. Měří se také respirační rychlost téhož aktivovaného kalu v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky za jinak stejných podmínek. Inhibiční účinek zkoušené látky při určité koncentraci se vyjádří v procentech průměrné respirační rychlosti ze dvou kontrol. Hodnota EC_{50} se vypočte ze stanovení při různých koncentracích.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Výsledky zkoušky jsou platné, jestliže

— se respirační rychlosti dvou kontrolních pokusů od sebe liší nejvýše o 15 %,

— EC_{50} (pro 30 minut a/nebo pro 3 hodiny) 3,5 dichlorfenolu leží v přijatelném rozmezí 5–30 mg/l.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. *Činidla*

1.6.1.1. Roztoky zkoušené látky

Roztoky zkoušené látky se připraví čerstvé na začátku studie s použitím zásobního roztoku. Postupuje-li se níže popsaným postupem, je vhodná koncentrace zásobního roztoku 0,5 g/l.

▼B

1.6.1.2. Roztok kontrolní látky

Roztok 3,5-dichlorfenolu lze připravit například rozpuštěním 0,5 g 3,5-dichlorfenolu v 10 ml 1 M NaOH, zředěním na přibližně 30 ml destilovanou vodou, za míchání přidáním 0,5M H_2SO_4 do začínajícího srážení – bude potřeba asi 8 ml 0,5M H_2SO_4 – konečným doplněním směsi destilovanou vodou na 1 litr. pH musí být poté 7 až 8.

1.6.1.3. Syntetická odpadní voda

Syntetická odpadní voda se připraví rozpuštěním následujícího množství látek v 1 litru vody:

— 16 g peptonu,

— 11 g masového extraktu,

— 3 g močoviny,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Poznámka 1: Tato syntetická odpadní voda má stonásobnou koncentraci oproti vodě popsané v technické zprávě OECD „Návrh metody stanovení biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek používaných v syntetických detergentech“ (11. června 1976), s přídavkem hydrogenfosforečnanu draselného.

Poznámka 2: Nepoužije-li se připravené médium ihned, přechovává se v temnu při 0–4 °C ne déle než jeden týden za podmínek, které nezpůsobují žádné změny v jeho složení. Médium může být před uschováním sterilizováno, nebo je možné pepton a masový extrakt přidat krátce před provedením zkoušky. Před použitím je nutné médium důkladně promíchat a upravit pH.

1.6.2. *Přístroje a pomůcky*

Měřicí aparatura: Přesná konstrukce není podstatná. Musí však mít volný prostor nad kapalinou a sonda musí přesně zapadat do hrdla odměrné baňky.

Kromě běžného laboratorního vybavení jsou nezbytné zejména tyto přístroje:

— měřicí přístroje,

— provzdušňovací zařízení,

— pH-metr s elektrodou,

— kyslíková elektroda.

1.6.3. *Příprava inokula*

Jako mikrobiální inokulum pro zkoušku se používá aktivovaný kal z čistírny odpadních vod čistící převážně odpadní vody z domácností.

Je-li to nutné, je možné při dodání kalu do laboratoře odstranit hrubé částice krátkodobým usazením (např. 15 minut) a dekantovat horní vrstvu jemnějších pevných částic pro použití. Alternativně je možné kal několik sekund promíchávat.

▼B

Pokud se kromě toho předpokládá, že je přítomna látka s inhibičním účinkem, promyje se kal vodovodní vodou nebo isotonickým roztokem. Po centrifugaci se supernatant dekantuje (tento postup se opakuje třikrát).

Malé množství kalu se zváží a vysuší. Z výsledku je možné vypočítat množství vlhkého kalu, které je nutné suspendovat ve vodě, aby se získal aktivovaný kal v oblasti koncentrací suspendovaných pevných látek ve směsné kapalině mezi 2 a 4 g/l. Dodrží-li se níže doporučený postup získá se zkušební médium s koncentrací kalu 0,8 až 1,6 g/l.

Není-li možné kal použít v den, kdy byl odebrán, přidá se ke každému litru aktivovaného kalu připraveného tak, jak je popsáno výše, 50 ml syntetické odpadní vody, kal se poté provzdušňuje přes noc při 20 ± 2 °C. Poté se během dne za provzdušňování udržuje až do použití. Před použitím se zkontroluje pH, a je-li třeba, upraví se na 6–8. Obsah suspendovaných pevných látek ve směsné kapalině se stanoví způsobem popsaným v předchozím odstavci.

Je-li třeba v následující dny použít stejné dávky kalu (nejvýše po čtyři dny), přidá se na konci každého pracovního dne dalších 50 ml syntetické odpadní vody na litr kalu.

1.6.4. *Provedení zkoušky*

Trvání/doba kontaktu:	30 minut a/nebo 3 hodiny, během kterých probíhá provzdušňování
Voda:	Pitná voda (v případě potřeby zbavená chlóru)
Přívod vzduchu:	Čistý vzduch, prostý oleje. Průtok 0,5–1 l/min
Měřicí aparatura:	Baňka s plochým dnem, jaká se používá pro stanovení BSK
Oxymetr:	Vhodná kyslíková elektroda se zapisovačem
Živný roztok:	Syntetická odpadní voda (viz výše)
Zkoušená látka	Roztok zkoušené látky se připraví čerstvý na začátku zkoušky
Referenční látka:	Např. 3,5-dichlorfenol (nejméně tři koncentrace)
Kontrola:	Naočkovaný vzorek bez zkoušené látky
Teplota:	20 ± 2 °C

Níže je uveden navržený experimentální postup, který je možné použít pro dobu kontaktu tři hodiny jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku:

Použije se několik nádob (např. kádinek na jeden litr).

Použije se alespoň pět koncentrací lišících se konstantním faktorem pokud možno nepřevyšujícím hodnotu 3,2.

V čase „0“ se 16 ml syntetické odpadní vody doplní vodou na 300 ml. Přidá se 200 ml mikrobiálního inokula a výsledná směs (500 ml) se převede do první nádoby (první kontrola C_1).

▼B

Zkušební nádoby je nutno nepřetržitě provzdušňovat, aby bylo zaručeno, že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 2,5 mg/l, a aby těsně před měřením respirační rychlosti byla koncentrace kyslíku přibližně 6,5 mg/l.

V čase „15 minut“ (15 minut je libovolně zvolený, avšak vhodný interval) se opakuje tentýž postup, který se liší pouze tím, že se k 16 ml syntetické odpadní vody přidá 100 ml zásobního roztoku zkoušené látky před doplněním vodou na 300 ml a přidáním mikrobiálního inokula na celkový objem 500 ml. Tato směs se poté převede do druhé nádoby a provzdušňuje se, jak bylo popsáno výše. Tento postup se opakuje v 15minutových intervalech s různými objemy zásobního roztoku zkoušené látky, čímž se získá řada nádob obsahujících různé koncentrace zkoušené látky. Nakonec se připraví druhá kontrola (C_2).

Po třech hodinách se zaznamená pH, dobře promíchaný vzorek obsahu první nádoby se převede do měřicí aparatury a v době do 10 minut se změří respirační rychlost.

Stanovení se opakuje u obsahu každé z nádob v 15minutových intervalech tak, že doba kontaktu v každé nádobě je tři hodiny.

Referenční látka se zkouší na každé dávce mikrobiálního inokula týmž způsobem.

Mají-li se měření provádět po 30 minutách kontaktu, je třeba použít jiný režim (např. použití více než jednoho oxymetru).

Je-li požadováno měření chemické spotřeby kyslíku, připraví se další nádoby obsahující zkoušenou látku, syntetickou odpadní vodu a čistou vodu, avšak žádný aktivovaný kal. Spotřeba kyslíku se změří a zaznamená po době provzdušňování 30 minut a/nebo tři hodiny (doba kontaktu).

2. **ÚDAJE A VYHODNOCENÍ**

Respirační rychlost se vypočte ze záznamu zapisovače mezi koncentracemi O2 přibližně 6,5 mg/l a 2,5 mg/l, nebo za období deseti minut, je-li respirační rychlost nízká. Úsek respirační křivky, ze které se vyhodnocuje respirační rychlost, musí být lineární.

Jestliže se respirační rychlosti v obou kontrolách od sebe liší o více než 15 % nebo EC_{50} referenční látky (za 30 min a/nebo tři hodiny) neleží v přijatelném rozmezí (5–30 mg/l pro 3,5-dichlorfenol), je zkouška neplatná a musí se opakovat.

Pro každou zkoušenou koncentraci (viz bod 1.2) se vypočte inhibice v %. Inhibice v % se vynese proti koncentraci do semilogaritmického (nebo logaritmicko-probitového) papíru a odečte se hodnota EC_{50}.

Standardními postupy lze stanovit pro hodnoty EC_{50} 95 % interval spolehlivosti.

▼B

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— zkoušená látka chemické identifikační údaje,

— systém použitý při zkoušce: zdroj, koncentrace a veškerá předběžná úprava aktivovaného kalu,

— zkušební podmínky:

  — pH reakční směsi před měřením respirace,

  — zkušební teplota,

  — doba trvání zkoušky,

  — referenční látka a její změřená hodnota EC_{50},

  — abiotická spotřeba kyslíku (pokud k ní dochází).

— výsledky:

  — všechny naměřené hodnoty,

  — křivka inhibice a metoda výpočtu EC_{50},

  — EC_{50} a podle možnosti 95 % interval spolehlivosti, EC_{20} a EC_{80},

  — veškerá pozorování a veškeré odchylky od této zkušební metody, které mohly ovlivnit výsledek.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Hodnotu EC_{50} je třeba považovat pouze za orientační hodnotu pravděpodobné toxicity zkoušené látky buď při zpracování odpadních vod aktivovaným kalem, nebo pro mikroorganismy v odpadních vodách, protože složité interakce, ke kterým dochází v životním prostředí, nelze přesně simulovat laboratorní zkouškou. Kromě toho zkoušené látky, které mohou mít inhibiční účinky na oxidaci amoniaku, mohou také způsobovat atypické inhibiční křivky. Proto je nutné interpretovat tyto křivky opatrně.

4. **LITERATURA**

1) Norma ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11, 1977, str. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, str. 245.

4) ETAD (Ecological and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, také popsáno v:

5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, str. 80.

6) Schefer, W., Textilveredlung 6, 1977, str. 247.

7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, rozhodnutí Rady C(84) 30 v konečném znění.

▼B

C.12. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS

1. METODA

1.1. ÚVOD

Účelem této metody je hodnocení potenciální úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsou-li po dlouhou dobu vystaveny poměrně vysokým koncentracím mikroorganismů. Životaschopnost mikroorganismů se udržuje po tuto dobu denními přídavky živin z usazené odpadní vody. (Pro potřebu během víkendů lze odpadní vodu přechovávat při 4 °C. Lze rovněž použít syntetickou odpadní vodu podle potvrzující zkoušky OECD.)

Při interpretaci výsledků (viz bod 3.2) je třeba vzít v úvahu, že může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných látkách.

V důsledku dlouhé doby zdržení kapalné fáze (36 hodin) a průběžného přidávání živin nesimuluje zkouška podmínky existující v čistírně odpadních vod. Výsledky získané při pokusech s různými zkoušenými látkami ukazují, že zkouška má vysoký potenciál biologického rozkladu.

Podmínky, za nichž probíhá zkouška, jsou vysoce příznivé pro výběr a/nebo adaptaci mikroorganismů schopných rozkládat zkoušenou látku. (Postup je možné použít také k získávání aklimatizovaných inokul, pro použití v jiných zkouškách.)

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku. Spíše než z rozdílu $C_{celk} - C_{anorg}$ se doporučuje stanovovat DOC po okyselení a přečistění.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látky (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

— jsou rozpustné ve vodě (nejméně 20 mg rozpuštěného organického uhlíku na litr),

— mají zanedbatelný tlak par,

— neinhibují bakterie,

— nejsou ve zkušebním systému významně adsorbovány,

— pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Musí být stanoven obsah organického uhlíku ve zkoušené látce.

▼B

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

C_T = koncentrace zkoušené látky na začátku provzdušňovacího cyklu, vyjádřená jako množství organického uhlíku přítomného nebo přidaného k usazené odpadní vodě (mg/l),

C_t = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušebního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l),

C_c = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušebního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l).

Biologický rozklad je v této metodě definován jako úbytek organického uhlíku. Biologický rozklad lze vyjádřit jako:

1. Procentuální úbytek D_{da} množství denně přidávané látky:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

kde

D_{da} = rozklad/denní přídavek.

2. Procentuální úbytek D_{ssd} množství látky přítomné na začátku každého dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

kde:

D_{ssd} = rozklad/množství látky na začátku dne,

indexy i a (i + 1) se vztahují ke dni měření.

Rovnice 2(a) se doporučuje, jestliže se DOC ve výtokové vodě ze dne na den mění, zatímco rovnici 2(b) lze použít v případě, že DOC zůstává ve výtokové vodě ze dne na den relativně konstantní.

▼B

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

V doplňku 1 jsou uvedeny údaje k několika sloučeninám vyhodnoceným v okružních testech; jsou určeny především pro potřebu občasné kalibrace metody a dále umožní srovnání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal z čistírny odpadních vod se vpraví do semikontinuální jednotky pro aktivovaný kal (SCAS, semi-continuous activated sludge unit). Přidá se zkoušená látka a usazená odpadní voda z domácností a směs se 23 hodin provzdušňuje. Provzdušňování se poté ukončí, kal se nechá usadit a supernatant se odstraní.

Zbývající kal v provzdušňovací komoře se pak smísí s další alikvotní části zkoušené látky a odpadní vody a cyklus se opakuje.

Biologický rozklad se určí stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu. Tato hodnota se porovná s hodnotou zjištěnou pro supernatant z kontrolní nádoby, do které byla přidána pouze usazená odpadní voda.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této metody založené na úbytku rozpuštěného organického uhlíku dosud nebyla stanovena. (Pokud jde o primární biologický rozklad, dosahuje se velmi přesných hodnot pro látky, které dosahují vysokého stupně rozkladu.)

Citlivost metody je ve velké míře dána kolísáním slepého pokusu a v menší míře přesností stanovení rozpuštěného organického uhlíku a obsahem zkoušené látky v kapalině na začátku každého cyklu.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

Pro každou zkoušenou látku a pro kontrolní zkoušky se sestaví dostatečný počet čistých provzdušňovacích jednotek, popřípadě je možné použít originální zkušební jednotku SCAS o obsahu 1,5 l, a trubice pro přívod vzduchu (obrázek 1). Stlačený vzduch přiváděný do zkušebních jednotek, přečištěný vatovým filtrem, nesmí obsahovat organický uhlík a musí být předem nasycen vodou, aby se snížily ztráty vypařováním.

Vzorek kapaliny s aktivovaným kalem obsahující 1–4 g suspendovaných pevných látek v 1 litru se získá z čistírny pracující s aktivovaným kalem, čistící převážně odpadní vody z domácností. Pro každou provzdušňovací jednotku je potřeba přibližně 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem.

▼B

Zásobní roztoky zkoušené látky se připravují s použitím destilované vody; obvykle se požaduje koncentrace 400 mg organického uhlíku na litr, aby se nastavila na začátku každého cyklu provzdušňování koncentrace zkoušené látky 20 mg uhlíku na litr, nedochází-li k biologickému rozkladu.

Umožňuje-li to toxicita pro mikroorganismy, jsou přípustné vyšší koncentrace.

Změří se obsah organického uhlíku zásobních roztoků.

1.6.2. *Zkušební podmínky*

Zkouška se provádí při 20–25 °C.

Použije se vysoká koncentrace aerobních mikroorganismů (1–4 g na litr suspendovaných látek) a efektivní doba zdržení je 36 hodin. Uhlíkaté látky v přiváděné odpadní vodě se ve velké míře oxidují, obvykle během osmi hodin po začátku každého cyklu provzdušňování. Poté kal po zbytek provzdušňovacího cyklu endogenně dýchá a v této době je jediným dostupným substrátem zkoušená sloučenina, pokud se také rychle nerozloží. Tyto skutečnosti spolu s denním opakovaným očkováním, používá-li se jako médium odpadní voda z domácnosti, vytvářejí vysoce příznivé podmínky jak pro aklimatizaci, tak pro vysoký stupeň rozkladu.

1.6.3. *Provedení zkoušky*

Odebere se vzorek kapaliny s aktivovaným kalem z vhodné čistírny pracující s aktivovaným kalem a čistící převážně odpadní vody z domácností nebo vzorek kapaliny z laboratorní jednotky a udržuje se v aerobních podmínkách až do použití v laboratoři. Každá provzdušňovací i kontrolní jednotka se naplní 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem (používá-li se originální jednotka pro zkoušku SCAS, je třeba uvedené objemy násobit 10) a zahájí se provzdušňování. Po 23 hodinách se provzdušňování ukončí a kal se nechá 45 minut usazovat. Postupně se otevřou kohouty všech nádob a odeberou se 100ml podíly supernatantu. Ke zbývajícímu kalu v každé provzdušňovací jednotce se přidá 100 ml usazené odpadní vody z domácností získané bezprostředně před použitím. Opět se zahájí provzdušňování. V této etapě se nepřidávají žádné zkoušené látky a do jednotek se denně přidává pouze odpadní voda z domácnosti do té doby, dokud není voda po usazení čirá. To trvá obvykle až dva týdny, během nichž se obsah rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu na konci každého provzdušňovacího cyklu přiblíží konstantní hodnotě.

Na konci této fáze se jednotlivé usazené kaly smísí a do každé jednotky se vpraví 50 ml výsledného směsného kalu.

Do kontrolních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml vody a do zkušebních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml příslušného zásobního roztoku zkoušené látky (400 mg/l). Znovu se zahájí provzdušňování a pokračuje se v něm 23 hodin. Kal se poté nechá 45 minut usazovat, odebere se supernatant a analyzuje se na obsah rozpuštěného organického uhlíku.

Výše uvedený postup plnění a odběru se opakuje v průběhu zkoušky denně.

▼B

Před usazováním může být nezbytné očistit stěny jednotek, aby se předešlo hromadění pevných látek nad hladinou kapaliny. Pro každou jednotku se použije samostatná stěrka nebo kartáč, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci.

V ideálním případě se rozpuštěný organický uhlík stanoví v supernatantu denně, ale připouštějí se i méně časté analýzy. Před analýzou se kapaliny zfiltrují přes promyté membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm nebo se odstředí. Vhodný membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík a při filtraci nesmí adsorbovat zkoušenou látku. Teplota vzorku po dobu, kdy je v odstředivce, nesmí přesáhnout 40 °C.

Délka zkoušky u látek, u nichž dochází k malému biologickému rozkladu nebo se nerozkládají vůbec, není stanovena, ale na základě zkušenosti lze doporučit, aby trvala nejméně 12 týdnů, ne avšak déle než 26 týdnů.

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu ve zkušebních jednotkách a v kontrolních jednotkách se vynesou do grafu proti času.

Po skončení biologického rozkladu by se koncentrace zjištěná ve zkušební jednotce měla blížit hodnotě v kontrolní jednotce. Jakmile se ve třech po sobě následujících měřeních zjistí, že rozdíl mezi oběma hladinami je konstantní, provede se takový počet dalších měření, který je postačující pro statistické vyhodnocení výsledků, a vypočte se procentuální hodnota biologického rozkladu zkoušené látky (D_{da} nebo D_{ssd}, viz bod 1.2).

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto údaje:

— veškeré informace o druhu odpadní vody, typu použité jednotky a o experimentálních výsledcích týkajících se zkoušené látky, referenční látky (pokud byla použita) a slepého pokusu,

— teplota,

— křivka úbytku s popisem, způsob výpočtu (viz bod 1.2),

— datum a lokalita, kde byly odebrány aktivovaný kal a odpadní voda, stav adaptace, koncentrace atd.,

— vědecké důvody pro jakékoli změny ve zkušebním postupu,

— podpis a datum.

▼B

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Protože látky, které mají být zkoušené touto metodou, nejsou snadno biologicky rozložitelné, bude obvykle jakýkoli úbytek DOC, ke kterému dojde pouze v důsledku biologického rozkladu, rozložený do dnů nebo týdnů, s výjimkou případů, kdy je aklimatizace náhlá, což se projeví náhlým vymizením zkoušené látky po několika týdnech.

Někdy však může hrát významnou úlohu fyzikálně-chemická adsorpce, která se projeví úplným nebo částečným úbytkem přidaného DOC na začátku. Další vývoj závisí na faktorech, jako jsou míra adsorpce a koncentrace suspendovaných látek v nepoužité výtokové vodě. Obvykle rozdíl mezi koncentrací DOC v supernatantech u kontrol a u zkušebních jednotek postupně vzrůstá z počáteční nízké hodnoty a tento rozdíl poté zůstává na nové hodnotě po zbytek experimentu, pokud nedojde k aklimatizaci.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky. To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrií).

Zkoušené látky, které vykazují v této zkoušce velký úbytek DOC, lze pokládat za potenciálně biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná.

Nízký nebo nulový úbytek DOC může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím látek značených ^{14}C. Při použití zkoušené látky značené ^{14}C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $^{14}CO_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musí být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

▼B

Doplněk 1

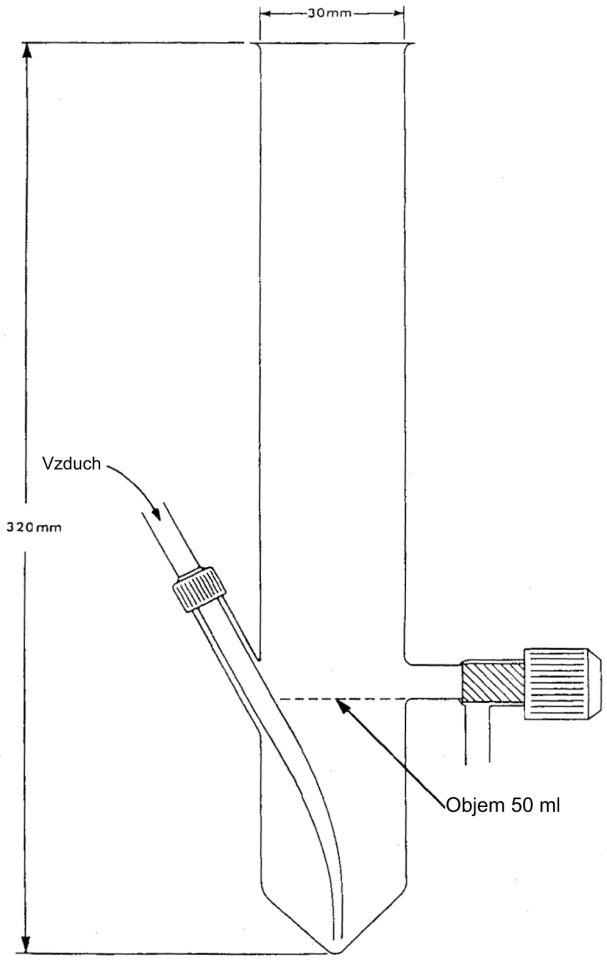
Zkouška SCAS: příklad výsledků

Látka	C_T (mg/l)	C_t–C_c (mg/l)	Procento biologického rozkladu D_{da}	Délka zkoušky (dny)
4-acetamidobenzen-1-sulfonát	17,2	2,0	85	40
4-dodecylbenzen-1-sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilin	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentantetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Doplněk 2

Příklad zkušební aparatury



▼B

C.13. **BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH**

1. **METODA**

Tato bioakumulační metoda je replikou metody OECD TG 305 (1996).

1.1. ÚVOD

V této metodě je popsán postup pro charakterizaci schopnosti látek bioakumulovat se v rybách za průtokových podmínek. Ačkoliv jsou průtokové režimy preferovány, připouštějí se i semistatické režimy, jsou-li splněna kritéria validace.

V metodě jsou dostatečně popsány podrobnosti pro provedení zkoušky, přičemž je poskytnuta dostatečná volnost pro přizpůsobení experimentálního uspořádání podmínkám v jednotlivých laboratořích a různým vlastnostem zkoušených látek. Metoda je nejefektivnější pro stabilní organické chemikálie s hodnotou log P_{ow} od 1,5 do 6,0 (1), ale může být také použita na superlipofilní látky (s hodnotou log P_{ow} > 6,0). Předběžně odhadnutý bioakumulační faktor (BCF), někdy označovaný jako $K_B$bude pro takové superlipofilní látky pravděpodobně vyšší než hodnota bioakumulačního faktoru v ustáleném stavu (BCF_{US}), která je očekávána z laboratorních experimentů. Předběžné odhady pro organické látky s hodnotou log P_{ow} až asi 9,0 lze získat pomocí rovnice Binteina at al (2). Mezi parametry, které charakterizují bioakumulační potenciál, patří rychlostní konstanta příjmu (k_2), rychlostní konstanta vylučování (k_1) a BCF_{US}.

Izotopově značené zkoušené látky mohou usnadnit analýzu vzorků vody a ryb a mohou být použity v případě, že by měla být provedena identifikace a kvantifikace produktů rozkladu. Měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku (například po spálení nebo solubilizaci tkáně), je hodnota BCF založena na výchozí sloučenině, všech zadržených metabolitech a také na asimilovaném uhlíku. Hodnoty BCF založené na celkovém obsahu radioaktivního zbytku tedy nemohou být přímo srovnatelné s hodnotou BCF získanou specifickou chemickou analýzou pouze výchozí sloučeniny.

V izotopových studiích mohou být pro stanovení BCF výchozí sloučeniny zařazeny čisticí postupy, a je-li to považováno za nezbytné, mohou být charakterizovány hlavní metabolity. Je možné rovněž kombinovat studii metabolismu ryb se studií bioakumulace analýzou a identifikací zbytků v tkáních.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Biokoncentrace/bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu (v jeho specifikované tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené látky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BCF or K_B) je koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich nebo v jejich specifikovaných tkáních (C_r as µg/g (ppm)) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_w as µg/ml (ppm)), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této zkoušce.

▼B

Bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BCF_{US} nebo K_B) se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu je po tuto dobu konstantní.

Plató nebo ustálený stav je stav dosažený tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti koncentrace zkoušené látky v rybách (C_r) rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy C_r vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o ± 20 % a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný výrazný rozdíl. Analyzují-li se spojené vzorky, požadují se čtyři po sobě jdoucí analýzy. v případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly.

Bioakumulační faktory vypočtené přímo z kinetických rychlostních konstant (k_1/k_2) se nazývají kinetické akumulační faktory (BCF_K).

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (P_{ow}je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemikálie v n-oktanolu a ve vodě (metoda A.8) a označuje se také jako K_{ow}. Logaritmus hodnoty P_{ow} se používá jako ukazatel potenciálu chemikálie bioakumulovat se ve vodních organismech.

Expozice nebo fáze příjmu je časový úsek, během něhož jsou ryby vystaveny působení zkoušené chemikálie.

Rychlostní konstanta příjmu (k_1) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené látky v testovacích rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních), jsouli ryby této chemikálii vystaveny (k_1 se vyjadřuje v jednotce/den).

Poexpoziční nebo vylučovací fáze je časový úsek po přemístění testovacích ryb z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování látky z testovacích ryb (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_2) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky v testovacích rybách (nebo v jejich specifikovaných tkáních) po jejich přemístění z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje (k_2 se vyjadřuje v jednotce/den).

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška má dvě fáze: fázi expozice (příjem) a poexpoziční fázi (vylučování). Během fáze příjmu jsou dvě oddělené skupiny ryb stejného druhu vystaveny alespoň dvěma koncentracím zkoušené látky. Poté jsou přemístěny do média, které zkoušenou látku neobsahuje, aby začala fáze vylučování. Fáze vylučování je vždy nezbytná, není-li příjem látky během fáze příjmu nevýznamný (např. je-li BCF menší než 10). Koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních) se sleduje v průběhu obou fází zkoušky. Vedle těchto dvou zkušebních koncentrací se za stejných podmínek, s výjimkou přítomnosti zkoušené látky, udržuje kontrolní skupina ryb, aby mohly být na odpovídající kontrolní skupině porovnány možné nepříznivé účinky pozorované při bioakumulačních zkouškách a aby byly získány koncentrace zkoušené látky v pozadí.

▼B

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že je rovnováhy dosaženo dříve. Délku fáze příjmu a dobu potřebnou k ustavení rovnovážného stavu lze předpovědět pomocí rovnice v příloze 3. Fáze vylučování poté začne po přemístění ryb do jiné nádrže bez zkoušené látky. Je-li to možné, vypočítají se bioakumulační faktory nejlépe jako poměr (BCF_{US}), tj. poměr koncentrace v rybách (C_r) a ve vodě (C_w) ve zřetelném rovnovážném stavu, a jako kinetický bioakumulační faktor BCF_K, tj. poměr rychlostních konstant příjmu (k_1) a vylučování (k_2) za předpokladu kinetiky prvního řádu. Neřídí-li se zjevně naměřené hodnoty kinetikou prvního řádu, měl by být použit složitější model (dodatek 5).

Nedojde-li k ustálenému stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve; poté začne fáze vylučování.

Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování (úbytku), bioakumulační faktor a, je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelu, který popisuje naměřené koncentrace zkoušené látky v rybách a ve vodě.

Faktor BCF se vyjadřuje jako funkce celkové živé hmotnosti ryby. Pro zvláštní účely však mohou být použity specifikované tkáně nebo orgány (např. svalovina, játra), je-li ryba dostatečně velká nebo je-li možné ji rozdělit na jedlý (vykostěný) podíl a nejedlý podíl (vnitřnosti). Vzhledem k tomu, že u mnoha organických látek existuje zřetelný vztah mezi schopností bioakumulace a lipofilností, existuje také odpovídající vztah mezi obsahem tuku v testovacích rybách a pozorovanou bioakumulací takové látky. Aby se tedy snížilo kolísání výsledků pro tyto látky s vysokou lipofilností (tj. s $\log P_{ow} > 3$), měla by být bioakumulace vztažena vedle celkové hmotnosti těla také k obsahu tuku.

Obsah tuku by měl být stanoven pokud možno na stejném biologickém materiálu, jaký je použit ke stanovení koncentrace zkoušené látky.

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Před prováděním zkoušek bioakumulace by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

— rozpustnost ve vodě,

— rozdělovací koeficient n-oktanol/voda P_{ow} (označovaný také jako K_{ow}, stanovený metodou HPLC, viz A.8),

— hydrolýza,

— fototransformace ve vodě stanovená ozářením slunečním nebo simulovaným slunečním světlem za podmínek zkoušky bioakumulace (3),

▼B

— povrchové napětí (u látek, u nichž nelze stanovit log P_{ow}),

— tlak par,

— v případě potřeby „snadná“ biologická rozložitelnost.

Další požadovanou informací je toxicita pro druh ryby, který má být použit, nejlépe asymptotická hodnota LC_{50} (tj. časově nezávislá). K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení zkoušené látky ve zkušebních roztocích a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků. Měly by být také známy meze stanovitelnosti zkoušené látky jak ve vodě, tak v rybích tkáních. Je-li použita zkoušená látka značená ^{14}C, měla by být známá aktivita nečistot vyjádřená v procentech.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

— kolísání teploty je menší než ± 2 °C,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení,

— koncentrace zkoušené látky v nádrži je udržována v intervalu ± 20 % kolem střední hodnoty naměřených hodnot během fáze příjmu,

— mortalita nebo jiné nepříznivé účinky a choroby jak u kontrolních, tak u exponovaných ryb je na konci zkoušky menší než 10 %; jestliže je zkouška prodloužena na několik týdnů nebo měsíců, měl by být úhyn nebo jiné nepříznivé účinky v obou skupinách ryb menší než 5 % za měsíc nebo by neměl překročit celkem 30 %.

1.6. REFERENČNÍ SLOUČENINY

Použití referenčních sloučenin o známém bioakumulačním potenciálu by mohlo být užitečné pro kontrolu experimentálního postupu. Zatím však ještě nelze doporučit žádné specifické látky.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. *Přístroje a pomůcky*

U všech částí zařízení je třeba se vyhýbat použití materiálů, které se mohou rozpouštět, sorbovat nebo vyluhovat a mají nepříznivý účinek na ryby. Lze použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádrže vyrobené z inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na náplň. Použití měkkých trubek z plastu by mělo být minimalizováno. Měly by být použity trubky z teflonu ®, z korozivzdorné oceli a/nebo ze skla. Zkušenosti ukázaly, že pro látky s vysokými absorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, je nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno.

▼B

1.7.2. *Voda*

Ke zkoušce se používá přírodní voda, která by měla být získána z nekontaminovaného zdroje stálé kvality. Ředicí voda musí mít kvalitu, která umožní přežití zvoleného druhu ryby po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazoval abnormální vzhled nebo chování. V ideálním případě by mělo být prokázáno, že testovací druh může v ředicí vodě přežít, růst a rozmnožovat se (např. zkouškou s laboratorní kulturou nebo zkouškou toxicity během životního cyklu). Voda by měla být charakterizována alespoň hodnotou pH, tvrdostí, celkovým obsahem pevných látek, celkovým obsahem organického uhlíku a podle možnosti také obsahem amoniaku a dusičnanů, alkalitou a v případě mořských druhů salinitou. Všechny parametry, které jsou důležité pro optimální prospívání ryb, jsou známy; v příloze I jsou přesto uvedeny doporučené maximální koncentrace pro řadu parametrů sladké a mořské vody.

Voda by měla mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,0 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ± 0,5. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav obsádky ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

Celkový přirozený obsah částic a rovněž obsah organického uhlíku (TOC) v ředicí vodě by měl být co nejnižší, aby nedošlo k adsorpci zkoušené látky na organických látkách, což může snížit její biologickou dostupnost (4). Maximální přijatelná hodnota je 5 mg/l pro částice (sušina zachycená filtrem 0,45 μm) a 2 mg/l pro celkový organický uhlík (viz dodatek 1). Je-li to nezbytné, měla by být voda před použitím filtrována. Příspěvek k obsahu organického uhlíku od testovacích ryb (exkrety) a ze zbytků potravy by měl být co nejmenší. V průběhu zkoušky by neměla koncentrace organického uhlíku ve zkušební nádrži překročit koncentraci organického uhlíku pocházejícího ze zkoušené látky a ze solubilizačního činidla, je-li použito, o více než 10 mg/l (±20 %).

1.7.3. *Zkušební roztoky*

Zásobní roztok zkoušené látky se připraví ve vhodné koncentraci. Zásobní roztok by měl být připraven nejlépe jednoduchým smícháním nebo protřepáním zkoušené látky s ředicí vodou. Použití rozpouštědel nebo dispersantů (solubilizačních činidel) se nedoporučuje; v některých případech však může být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Rozpouštědly, která mohou být použita, jsou ethanol, methanol, ethylenglykol-monomethylester, ethylenglykol-dimethylester, dimethylformamid a triethylenglykol. Dispersanty, které mohou být použity, jsou Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Zkoušená látka může být značena radioaktivními izotopy a měla by být nejvyšší čistoty (např. > 98 %).

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění koncentrací zkoušené látky nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. měřicí čerpadlo, proporcionální ředění, saturační systém). Přijatelná je výměna nejlépe pěti objemů v každé zkušební nádrži za den. Upřednostňuje se průtokový režim, není-li to však možné (např. jsou-li testovací organismy nepříznivě ovlivňovány), může být použita semistatická technika za předpokladu, že jsou splněna kritéria validity. Rychlosti průtoku zásobního roztoku a ředicí vody by měly být kontrolovány jak 48 hodin před zkouškou, tak poté alespoň denně během zkoušky. Tato kontrola by měla zahrnovat stanovení rychlosti průtoku v každé testovací nádrži a měla by zajistit, aby se rychlost průtoku neměnila o více než 20 % v rámci jedné nádrže nebo mezi nádržemi.

1.7.4. *Výběr druhů*

Důležitými kritérii pro výběr druhu jsou jeho dostupnost, možnost získat jej ve vyhovující velikosti a jeho bezproblémové udržování v laboratoři. Dalšími kritérii pro výběr druhu ryb jsou jeho rekreační, komerční a ekologický význam a rovněž srovnatelná citlivost, úspěšné dřívější použití atd.

Doporučené druhy jsou uvedeny v příloze 2. Mohou být použity i jiné druhy, avšak zkušební postup musí být upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.7.5. *Chov ryb*

Obsádka ryb se nechá aklimatizovat alespoň dva týdny při zkušební teplotě a krmí se odpovídající stravou stejného typu jako v průběhu zkoušky.

Po 48 hodinách aklimatizace se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— úhyn vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— úhyn 5 až 10 % populace za sedm dnů: nechat aklimatizovat dalších sedm dnů,

— úhyn nižší než 5 % populace za sedm dnů: násada se přijímá; dojde-li během dalších sedmi dnů k úhynu vyššímu než 5 %, celá obsádka se vymění.

Zajistí se, aby ryby použité pro zkoušku nevykazovaly pozorovatelné nemoci a abnormality. Všechny nemocné ryby se vymění. Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

▼B

1.8. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.8.1. *Předběžná zkouška*

Může být užitečné provést předběžný experiment s cílem optimalizovat zkušební podmínky konečné zkoušky, např. výběr koncentrace (koncentrací) zkoušené látky, délka fáze příjmu a fáze vylučování.

1.8.2. *Podmínky expozice*

1.8.2.1. Délka fáze příjmu

Předpověď délky fáze příjmu lze získat z praktických zkušeností (např. z dřívější studie nebo podle chemikálie podobné akumulace) nebo z určitých empirických vztahů využívajících znalosti buď rozpustnosti ve vodě, nebo rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda pro zkoušenou látku (viz dodatek 3).

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že je rovnováhy dosaženo dříve. Nedosáhne-li se ustáleného stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení, přičemž se provádějí další měření, nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve.

1.8.2.2. Délka fáze vylučování

Doba odpovídající polovině délky fáze příjmu je obvykle dostatečná k tomu, aby se přiměřeně snížil (např. o 95 %) obsah látky v organismu (vysvětlení odhadu – viz dodatek 3). Jestliže doba nezbytná pro dosažení 95 % úbytku je neprakticky dlouhá, překračuje například dvakrát běžnou délku fáze příjmu (tj. více než 56 dnů), může být použita kratší doba (tj. dokud není koncentrace zkoušené látky menší než 10 % koncentrace v rovnovážném stavu). V případě látek se složitějším charakterem příjmu a vylučování, než jaký představuje model ryby s jedním kompartmentem řídícím se kinetikou prvního řádu, však delší fáze vylučování umožní stanovit rychlostní konstanty úbytku. Délka fáze však může být určena dobou, po kterou zůstává koncentrace zkoušené látky v rybách nad mezí detekce analytické metody.

1.8.2.3. Počty testovacích ryb

Počet ryb na jednu zkušební koncentraci se zvolí tak, aby byly pro každý odběr k dispozici nejméně čtyři ryby na jeden vzorek. Je-li požadována větší statistická váha, budou pro vzorek nezbytná větší množství ryb.

Použijí-li se pohlavně dospělé ryby, uvede se, zda byly v experimentu použity samice nebo samci nebo obojí. Jsou-li použita obě pohlaví, mělo by být před započetím expozice prokázáno, že rozdíl v obsahu lipidů mezi oběma pohlavími není významný; oddělení samců a samic může být nezbytné.

▼B

V každé zkoušce se vyberou ryby podobné hmotnosti, tak aby hmotnost nejmenší z nich nebyla nižší než dvě třetiny hmotnosti největší ryby. Všechny by měly být stejného stáří a měly by pocházet ze stejného zdroje. Vzhledem k tomu, že stáří a hmotnost ryby mají zřejmě často významný vliv na hodnoty BCF (1), musí být tyto podrobnosti přesně zaznamenány. Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek obsádky ryb s cílem odhadnout střední hmotnost.

1.8.2.4. N á s a d a

Volí se vysoký poměr množství vody k množství ryb, aby se minimalizovalo snížení koncentrace C_W způsobené přidáním ryb na začátku zkoušky, a také proto, aby nedošlo k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku. Je důležité, aby rychlost nasazování byla přiměřená použitému druhu. V každém případě se obvykle doporučuje rychlost nasazování 0,1 až 1,0 g ryb (živá hmotnost) na litr vody za den. Vysoká rychlost nasazování může být zvolena, je-li prokázáno, že požadovaná koncentrace zkoušené látky může být udržována v mezích ± 20 % a že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení.

Při volbě režimu nasazování má být přihlédnuto k obvyklému přirozenému prostředí ryb. Například ryby žijící u dna mohou vyžadovat při stejném objemu vody větší plochu dna než pelagické druhy ryb.

1.8.2.5. K r m e n í

Během aklimatizace a po dobu zkoušky se ryby krmí vhodnou stravou se známým obsahem tuku a celkových bílkovin podávanou v množství dostatečném pro udržení zdravého stavu a pro udržení tělesné hmotnosti. Ryby se krmí denně v průběhu aklimatizace a po dobu zkoušky množstvím přibližně 1 až 2 % tělesné hmotnosti; tím se udrží v průběhu zkoušky obsah tuku u většiny druhů ryb na relativně konstantní úrovni. Množství krmiva by mělo být například jednou týdně nově přepočítáno, aby byla udržena odpovídající tělesná hmotnost a obsah tuku. Hmotnost ryb v každé nádrži může být pro tento výpočet odhadnuta z hmotnosti ryb naposledy odebraných z dotyčné nádrže. Ryby, které zůstaly v nádrži, se neváží.

Nezkrmená potrava a exkrety se odstraňují z nádrží odsátím denně krátce po krmení (30 minut až 1 hodina). Nádrže se udržují v celém průběhu zkoušky v co nejvyšší čistotě, aby byla koncentrace organických látek co nejnižší, neboť přítomnost organického uhlíku může snižovat biologickou dostupnost zkoušené látky (1).

Poněvadž mnoho krmiv pochází z rybí moučky, mělo by být krmivo analyzováno na přítomnost zkoušené látky. Je rovněž žádoucí, aby bylo krmivo analyzováno na přítomnost pesticidů a těžkých kovů.

▼B

1.8.2.6. Světlo a teplota

Fotoperioda je obvykle 12 až 16 hodin a teplota (± 2 °C)) by měla odpovídat testovacímu druhu (viz dodatek 2). Druh a charakteristiky osvětlení by měly být známy. Měla by být věnována pozornost možné fototransformaci zkoušené látky za světelných podmínek studie. Mělo by být použito vhodné osvětlení, aby ryby nebyly vystaveny fotoproduktům nevyskytujícím se v přírodě. V některých případech může být vhodné použít filtr pro odfiltrování UV záření s vlnovou délkou kratší než 290 nm.

1.8.2.7. Zkušební koncentrace

Ryby jsou vystaveny za průtokových podmínek alespoň dvěma koncentracím zkoušené látky ve vodě. Vyšší (nejvyšší) koncentrace zkoušené látky se obvykle volí tak, aby byla na úrovni 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50} a aby byla desetkrát vyšší než je mez detekce této látky ve vodě při použité analytické metodě.

Nejvyšší zkušební koncentraci lze také stanovit dělením akutní 96hodinové LC_{50} příslušným poměrem akutní/chronická letální dávka (u některých chemikálií může koeficient ležet mezi 3 a 100). Je-li to možné, volí se další koncentrace tak, aby se lišila od výše uvedené faktorem 10. Není-li to možné z důvodu kritéria 1 % z LC_{50} nebo z důvodu kritéria meze detekce, může být použit nižší faktor než 10 nebo by mělo být zváženo použití zkoušené látky značené ^{14}C. Žádná koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky.

Je-li použito solubilizační činidlo, neměla by jeho koncentrace být vyšší než 0,1 ml/l a mělo by být stejné ve všech zkušebních nádržích. Jeho příspěvek, společně s příspěvkem zkoušené látky, k celkovému obsahu organického uhlíku ve zkušební vodě by měl být znám. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

1.8.2.8. Kontrolní experimenty

Vedle zkušební série by měl být proveden kontrolní experiment s ředicí vodou, která popřípadě obsahuje solubilizační činidlo, pokud bylo zjištěno, že toto činidlo nemá na ryby žádné účinky. Není-li tomu tak, měly by být provedeny oba kontrolní experimenty.

1.8.3. *Četnost měření kvality vody*

V průběhu zkoušky by mělo být v každé nádrži měřeno množství rozpuštěného kyslíku, TOC, pH a teplota. Celková tvrdost a popřípadě salinita by měly být měřeny v kontrolních experimentech a v jedné nádrži s vyšší (nejvyšší) koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a popřípadě salinita by měly být měřeny alespoň třikrát – na začátku, přibližně uprostřed a na konci fáze příjmu – a jednou týdně ve fázi vylučování. Hodnota TOC by měla být měřena na začátku zkoušky (24 hodin a 48 hodin před započetím fáze příjmu) před nasazením ryb a alespoň jednou týdně jak v průběhu fáze příjmu, tak v průběhu fáze vylučování. Teplota by měla být měřena denně, pH na začátku a na konci každé fáze a tvrdost vody jednou v průběhu zkoušky. Teplota by měla být měřena nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné nádrži.

▼B

1.8.4. *Odběr vzorků a analýza ryb a vody*

1.8.4.1. Časový rozvrh odebírání vzorků ryb a vody

Voda ze zkušebních nádrží se pro stanovení koncentrace zkoušené látky odebírá před nasazením ryb a během fáze příjmu i během fáze vylučování. Voda se odebírá alespoň ve stejnou dobu jako ryby a před krmením. Během fáze příjmu se stanovují koncentrace zkoušené látky, aby se ověřilo, že jsou v souladu s kritérii validity.

Ryby se odebírají alespoň pětkrát během fáze příjmu a alespoň čtyřikrát během fáze vylučování. Vzhledem k tomu, že v mnoha případech bude obtížné s tímto počtem vzorků vypočítat rozumně přesný odhad hodnoty BCF, zejména jde-li o jinou než jednoduchou kinetiku prvního řádu, může být účelné odebírat vzorky v obou fázích častěji (viz dodatek 4). Dodatečné vzorky se uloží a analyzují až poté, co se výsledky prvního kola analýz ukáží jako nedostatečné pro výpočet hodnoty BCF o požadované přesnosti.

Příklad přijatelného časového rozvrhu odběru vzorků je uveden v příloze 4. Jiné plány lze snadno odvodit pomocí jiné předpokládané hodnoty P_{ow}, s níž se vypočítá expoziční doba pro 95 % příjem.

V odběru vzorků se pokračuje během fáze příjmu do dosažení ustáleného stavu nebo po dobu 28 dnů, podle toho, co nastane dříve. Není-li ustáleného stavu dosaženo do 28 dnů, v odběru vzorků se pokračuje do ustavení ustáleného stavu nebo do 60 dnů, podle toho, co nastane dříve. Před zahájením fáze vylučování se ryby přemístí do čistých nádrží.

1.8.4.2. Odběr vzorků a příprava vzorků

Vzorky vody pro analýzy se odebírají například odsáváním potrubím z inertního materiálu ze středu zkušební nádrže. Vzhledem k tomu, že se biologicky nedostupná frakce zkoušené látky nedá často oddělit od biologicky dostupné frakce ani filtrací, ani odstředěním (zejména v případě superlipofilních chemikálií, tj. chemikálií s log P_{ow} > 5) (1, 5), nemohou být vzorky takto zpracovány.

Namísto toho je třeba učinit opatření pro to, aby byly nádrže udržovány co nejčistší, a obsah organického uhlíku by měl být pravidelně monitorován jak během fáze příjmu, tak během fáze vylučování.

Při každém odběru se z nádrží odebere vhodný počet ryb (obvykle alespoň čtyři). Odebrané ryby se rychle omyjí pod tekoucí vodu, důkladně se osuší, ihned se usmrtí nejvhodnější humánní metodou a zváží se.

Ryby a voda se pokud možno analyzují ihned po odběru s cílem předejít degradaci nebo ztrátám a vypočítat přibližné rychlosti příjmu a vylučování ještě v průběhu zkoušky. Okamžitá analýza rovněž zabrání opožděnému stanovení plató při jeho dosažení.

▼B

Neprovádí-li se analýza okamžitě, vzorky se vhodným způsobem uchovají. Před zahájením studie je třeba zjistit informace o řádné metodě uchovávání vzorků s ohledem na dotyčnou zkoušenou látku – například hluboké zmrazení, udržování při 4 °C, délka uchovávání, vyluhování atd.

1.8.4.3. Kvalita analytické metody

Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně správností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkoušené látky, je třeba experimentálně kontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z vody, tak ze vzorků ryb jsou pro danou analytickou metodu dostatečné. Kontroluje se také, zda se zkoušená látka nevyskytuje v použité ředicí vodě.

Hodnoty C_w and C_r se podle potřeby korigují na výtěžky a hodnoty pozadí v kontrolních experimentech. Vzorky ryb a vody se zpracovávají tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce odběrným zařízením).

1.8.4.4. Analýza vzorků ryb

Je-li ve zkoušce použit materiál značený radioizotopy, je možné provést analýzu na celkovou aktivitu (tj. pro výchozí látku i s metabolity) nebo lze provést separaci, tak aby mohla být výchozí látka analyzována samostatně. Také hlavní metabolity mohou být charakterizovány v rovnovážném stavu nebo na konci fáze příjmu, podle toho, k čemu dojde dříve. Je-li hodnota BCF vyjádřená celkovou aktivitou reziduí ≥ 1 000 %, může být účelné, a pro určité kategorie chemikálií, např. pesticidy, se to důrazně doporučuje, identifikovat a kvantifikovat produkty rozkladu představující ≥ 10 % celkového množství reziduí v tkáních ryb v ustáleném stavu. Jsou-li produkty rozkladu představující ≥ 10 % celkových značených reziduí identifikovány a kvantifikovány, doporučuje se také identifikovat a kvantifikovat produkty rozkladu ve zkušební vodě.

Koncentrace zkoušené látky by měla být obvykle stanovena pro každou jednotlivou zváženou rybu. Není-li to možné, mohou být vzorky při každém odběru sdružovány, avšak sdružování omezuje statistické postupy, které lze na údaje aplikovat. Pokud je důležitý určitý statistický postup a statistická váha, měl by být ve zkoušce nasazen přiměřený počet ryb vyhovující požadovanému sdružování a statistické váze (6, 7).

Hodnota BCF by měla být vyjádřena jako funkce celkové hmotnosti a v případě lipofilních látek také jako funkce obsahu lipidů. Obsah lipidů v rybách se stanoví pokud možno při každém odběru. Pro stanovení obsahu lipidů by měla být použita vhodná metoda (odkazy 8 a 2 v příloze 3). Jako standardní metoda může být doporučena technika extrakce směsí chloroform a methanol (9). Různé metody neposkytují stejné hodnoty (10), a proto je důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, měla by být analýza lipidů provedena na extraktu připraveném pro analýzu zkoušené látky, neboť lipidy musí být často před chromatografickou analýzou odstraněny. Obsah lipidů v rybách (v mg/kg živé hmotnosti) na konci experimentu by se neměl lišit od jejich obsahu na počátku o více než ± 25 %. Měl by být uveden také podíl pevných látek v tkáních, aby bylo možné provést přepočet koncentrace tuků z živé hmotnosti na sušinu.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Křivka příjmu zkoušené látky se sestrojí vynesením její koncentrace v rybách nebo na nich (nebo ve specifikovaných tkáních) v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka plató, tj. pokud začíná být rovnoběžná s časovou osou, vypočítá se hodnota BCF_{us} v rovnovážném stavu z poměru:

$$\frac{C_r \text{ v ustáleném stavu (střední hodnota)}}{C_v \text{ v ustáleném stavu (střední hodnota)}}$$

Není-li dosaženo ustáleného stavu, je možné vypočítat hodnotu BCF_{us} s dostatečnou přesností pro posouzení rizika z ustáleného stavu při 80 % ($1{,}6/k_2$) nebo 95 % ($3{,}0/k_2$) rovnováze.

Také akumulační faktor (BCF_K se stanoví jako poměr dvou rychlostních konstant prvního řádu k_1/k_2. Rychlostní konstanta vylučování (k_2) se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkoušené látky v rybách v čase). Rychlostní konstanta příjmu se poté vypočte pomocí hodnoty (k_1) k_2 a hodnoty C_r, odvozené z křivky příjmu (viz také dodatek 5). Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty BCF_K a rychlostních konstant k_1 a k_2 je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače (11). K výpočtu hodnot k_1 a k_2 lze jinak použít grafické metody. Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v příloze 3) a měl by být konzultován biostatistik.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace zkoušených roztoků pohybují na úrovních blízkých mezi detekce analytické metody.

Jasně vymezené křivky příjmu a úbytku jsou ukazatelem dobré kvality údajů o bioakumulaci. Rozdíl konstant příjmu a vylučování pro dvě zkušební koncentrace by měl být nižší než 20 %. Pozorované významné rozdíly v rychlostech příjmu a vylučování mezi dvěma použitými zkušebními koncentracemi by měly být zaznamenány a mělo by být uvedeno jejich možné vysvětlení. Interval spolehlivosti hodnot BCF u dobře navržených studií se obecně blíží ± 20 %.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

3.1. ZKOUŠENÁ LÁTKA

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemické identifikační údaje (včetně obsahu organického uhlíku, je-li to třeba),

— v případě značení radioaktivními izotopy jejich přesná poloha a aktivita nečistot, vyjádřená v procentech.

▼B

3.2. TESTOVACÍ DRUH

— vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, rozmezí velikostí atd.

3.3. ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY:

— použitý zkušební postup (např. průtokový nebo semistatický),

— typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádrží, rychlost výměny objemu vody, počet opakování, počet ryb v jednom opakování, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků ryb a vzorků vody),

— metoda přípravy zásobních roztoků a častost jejich obnovování (je-li použito solubilizační činidlo, musí být uvedena jeho koncentrace a jeho příspěvek k obsahu organického uhlíku ve vodě),

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení,

— zdroj ředicí vody, popis jakékoli předchozí úpravy, výsledky jakéhokoli prokazování schopnosti zkušebních ryb žít v této vodě a charakteristiky vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, hodnota pH, tvrdost vody, obsah TOC, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (například typ krmiva, zdroj, složení – alespoň pokud možno obsah lipidů a bílkovin, podávané množství a četnost),

— informace o zpracování vzorků ryb a vody, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, o extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku a obsah tuku (je-li měřen).

3.4. VÝSLEDKY:

— výsledky jakýchkoli provedených předběžných studií,

— úhyn kontrolních ryb a ryb v každé expoziční nádrži a jakékoli pozorované neobvyklé chování,

— obsah lipidů v rybách (je-li stanoven při zkoušce),

— křivky (včetně všech naměřených údajů) příjmu a vylučování zkoušené chemikálie rybami, doba dosažení ustáleném stavu,

▼B

— hodnoty Cr a Cv (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota Cr se vyjadřuje v μg/g živé hmotnosti (ppm) celého těla nebo specifikovaných tkání, např. lipidů, a Cv se vyjadřuje v μg/ml (ppm)); hodnoty Cv pro kontrolní experimenty (měly by být uvedeny také hodnoty pozadí),

— bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BCF_{us}) a/nebo kinetický akumulační faktor (BCF_k) a popřípadě 95 % meze spolehlivosti pro rychlostní konstanty příjmu a vylučování (úbytku) (vše vztaženo na celý organismus a na celkový obsah lipidů v rybě, je-li stanoven, nebo na její specifikované tkáně), intervaly spolehlivosti a směrodatné odchylky (jsou-li k dispozici) a metody výpočtu nebo analýzy údajů pro každou použitou koncentraci zkoušené látky,

— v případě použití látek značených radioaktivními izotopy a je-li to nutné, musí být uvedena akumulace jakýchkoli detekovaných metabolitů,

— všechny zvláštnosti zkoušky, všechny odchylky od těchto postupů a ostatní relevantní informace.

Výsledky typu „nedetekováno při uvedené mezi detekce“ by se měly minimalizovat předběžným vývojem metod a uspořádáním experimentu, neboť takové výsledky nelze pro výpočet rychlostních konstant použít.

4. LITERATURA

1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, str. 117–156.

2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29–390.

3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.

4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

7) US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“ Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.

▼B

9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099–1105.

10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, str. 1431–1436.

11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

DODATEK 1

Chemické charakteristiky přijatelné ředicí vody

	Látka	Koncentrační limit
1	Částice pevné	5 mg/l
2	Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
3	Neionizovaný amoniak	1 µg/l
4	Zbytkový chlor	10 µg/l
5	Celkové organické fosforové pesticidy	50 ng/l
6	Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	50 ng/l
7	Celkový organický chlor	25 ng/l
8	Hliník	1 µg/l
9	Arsen	1 µg/l
10	Chrom	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Měď	1 µg/l
13	Železo	1 µg/l
14	Olovo	1 µg/l
15	Nikl	1 µg/l
16	Zinek	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Rtuť	100 ng/l
19	Stříbro	100 ng/l

▼B

DODATEK 2

Doporučené druhy ryb pro zkoušení

	Doporučený druh	Doporučené rozpětí teploty při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka těla testovacích jedinců (cm)
1	Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) danio pruhované	20–25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), střevle	20–25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus), kapr obecný	20–25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel), halančík japonský	20–25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), živorodka duhová	20–25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus), slunečnice	20–25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), pstruh duhový	13–17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus), koljuška tříostná	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. R. Soc. London, Ser. B., sv. 252, str. 231.

V různých zemích byly použity různé druhy estuarinních a mořských druhů, například:

ryba z čeledi Scienidae (smuhovití)	*Leiostomus xanthurus*
halančík	*Cyprinodon variegatus*
ryba z čeledi Argentinidae (stříbronicovití)	*Menidia beryllina*
ryba z čeledi Enbiotocidae (příbojkovití)	*Cymatogaster aggregata*
platýz z čeledi Pleuronectidae	*Parophrys vetulus*
vranka z čeledi Cottidae	*Leptocottus armatus*
koljuška tříostná	*Gasterosteus aculeatus*
mořčák z čeledi Moronidae	*Dicentracus labrax*
ouklej obecná	*Alburnus alburnus*

Opatřování ryb

Sladkovodní ryby uvedené v tabulce se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok, zatímco dostupnost mořských nebo estuarinních ryb je omezena na určité země. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

▼B

DODATEK 3

Předpověď délky fáze příjmu a fáze vylučování

1. *Předpověď délky fáze příjmu*

Před provedením zkoušky lze získat odhad hodnoty k_2 a odtud lze získat dobu nezbytnou pro dosažení určitého stupně rovnovážného stavu (v procentech) z empirických vztahů mezi k_2 a rozdělovacím koeficientem noktanol/voda (P_{ov}) nebo mezi k_2 a rozpustností ve vodě (s).

Odhad hodnoty k_2 (den^{-1}) lze získat například z tohoto empirického vztahu (1):

$$\log_{10} k_2 = -0{,}414 \log_{10} (P_{o/v}) + 1{,}47 \ (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(rovnice 1)}$$

Další vztahy viz odkaz (2).

Není-li rozdělovací koeficient (P_{ov}) znám, lze jej odhadnout (3) ze znalosti rozpustnosti látky ve vodě (s) pomocí vztahu:

$$\log_{10} (P_{o/v}) = -0{,}862 \log_{10} (s) + 0{,}710 \ (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(rovnice 2)}$$

kde

s = rozpustnost (v mol/l): (n=36).

Tyto vztahy platí pouze pro chemikálie s hodnotou log P_{ov} od 2 do 6,5 (4).

Dobu, za kterou dojde k dosažení určitého stupně rovnovážného stavu vyjádřeného v procentech, lze získat pomocí odhadu hodnoty k_2–z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu):

$$\frac{dC_r}{dt} = k_1 \cdot C_v - k_2 \cdot C_r$$

nebo je-li C_v konstanta:

$$C_r = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_v(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(rovnice 3)}$$

Pro blízký ustálený stav ($t \to \infty$), může být rovnice 3 zjednodušena (5, 6) na:

$$C_r = \frac{k_1}{k_2} . C_v \text{nebo } C_r/C_v = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Pak $(k_1/k_2) \times C_v$ je přiblížením ke koncentraci v rybách v „ustáleném stavu“ ($C_{r,\,s}$).

Rovnice 3 může být přepsána na rovnici:

$$C_r = C_{r,s} \ (1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_r}{C_{rs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(rovnice 4).}$$

Při použití rovnice 4 lze předpovědět dobu potřebnou k dosažení určitého stupně ustáleného stavu vyjádřeného v procentech, je-li hodnota k_2 předem odhadnuta z rovnice 1 nebo 2.

▼B

Je pravidlem, že statisticky optimální délka fáze příjmu pro získání statisticky přijatelných údajů (BCF_K) je doba nezbytná k tomu, aby křivka sestrojená vynesením logaritmu koncentrace zkoušené látky v rybách proti času v lineárním měřítku dosáhla svého středního bodu, popřípadě $1,6/k_2$ neboli 80 % ustáleného stavu, ale ne více než $3,0/k_2$ neboli 95 % rovnovážného stavu (7).

Doba nezbytná pro dosažení 80 % ustáleného stavu je (rovnice 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{(rovnice 5).}$$

Podobně 95 % ustáleného stavu je dosaženo:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{(rovnice 6).}$$

Například délka fáze příjmu (fp) pro zkoušenou látku s $P_{ov} = 4$ je (při použití rovnic 1, 5 a 6):

$\log_{10} k_2 = - 0,414.(4) + 1,47 \qquad k_2 = 0,652 \text{ den}^{-1}$

nebo fp (80 %) = 1,6/0,652, tj. 2,45 dnů (59 hodin)

fp (95 %) = 3,0/0,652, tj. 4,60 dnů (110 hodin)

Podobně pro zkoušenou látku s hodnotou $s = 10^{-5}$ mol/l (log(s) = - 5,0) je délka fáze příjmu (při použití rovnic 1, 2, 5 a 6):

$\log_{10} (P_{o/v}) = - 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} K_2 = 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246 \text{ den}^{-1}$

fp (80 %) = 1,6/0,246, tj. 6,5 dnů (156 hodin)

nebo fp (95 %) = 3,0/0,246,tj. 12,2 dnů (293 hodin).

Rovnice

$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{o/v} + 55,31$ (hodin)

může být eventuálně použita pro výpočet doby potřebné pro dosažení efektivního ustáleného stavu (4).

2. *Předpověď délky fáze vylučování*

Předpověď doby nezbytné pro snížení obsahu látky v organismu na určitou procentuální úroveň počáteční koncentrace může být rovněž získána z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu) (1, 8):

V případě fáze vylučování se C_v předpokládá rovna nule. Rovnice může být zjednodušena na rovnici:

$$\frac{dC_r}{dt} = -k_2 C_r \text{ nebo } C_r = C_{r,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

kde $C_{r,\,o}$ je koncentrace na počátku fáze vylučování. 50 % vyloučení bude dosaženo v čase (t_{50}):

$$\frac{C_r}{C_{r,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ nebo } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobně 95 % vyloučení bude dosaženo v čase

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Je-li pro první fázi zvoleno dosažení 80 % příjmu ($1,6/k_2$) a pro fázi vylučování je zvoleno dosažení 95 % úbytku ($3,0/k_2$), je délka fáze vylučování přibližně dvojnásobkem délky fáze příjmu.

Je však důležité poznamenat, že odhady jsou založeny na předpokladu, že se příjem a vylučování řídí kinetikou prvního řádu. Neřídí-li se zřejmě kinetikou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (např. odkaz (1)).

Literatura (k příloze 3)

1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, str. 309–320.

2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), str. 4–10.

4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), str. 701–707.

5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), str. 785–792.

6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 str. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, str. 614–622.

8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, str. 3–19.

▼B

DODATEK 4

Teoretický příklad plánu odběru vzorků pro bioakumulační zkoušky látek s log P_{ow} = 4

Odběr vzorků ryb	Plán dob odběru vzorků		Počet vzorků vody	Počet ryb na vzorek
	Minimální požadovaná četnost (dny)	Dodatečný odběr vzorků		
Fáze příjmu	– 1 0		2 (*) 2	Přídavek 45 až 80 ryb
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Fáze vylučování				Přenesení ryb do vody neobsahující zkoušené chemikálie
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Odběr vzorku vody po dodání alespoň tří „objemů nádrže“.

Hodnoty v závorkách jsou počty vzorků (vody, ryb), které mají být odebrány, je-li prováděn dodatečný odběr.

Poznámka: Předběžný odhad k_2 pro log P_{ov} rovný 4,0 je 0,652 den^{-1}. Celková délka experimentu je stanovena na 3 × fp = 3 × 4,6 dnů, tj. 14 dnů. Odhad hodnoty „fp“ viz dodatek 3.

▼B

DODATEK 5

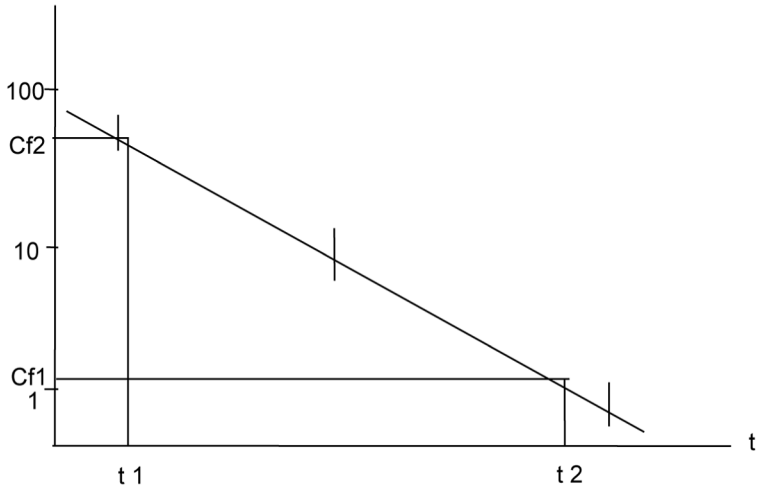
Omezení modelu

U většiny údajů týkajících se bioakumulace se předpokládá, že jsou „rozumně“ dobře popsány jednoduchým dvoukompartmentovým nebo dvouparametrovým modelem, jak je patrné z přímky, která je aproximací bodů pro koncentrace v rybách během fáze vylučování, je-li vynesena na semilogaritmickém papíru. (Nelze-li tyto body popsat přímkou, měl by být použit složitější model, viz například Spacie a Hamelink, odkaz 1 v příloze 3.)

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty vylučování (úbytku) k_2

Koncentrace zkoušené látky nalezená v každém vzorku ryb se vynese na semilogaritmickém papíru proti času odběru vzorků. Směrnice této přímky je rovna k_2.

$$k_2 = \frac{\ln\,(C_{r1}/C_{r2})}{t_2 - t_1}$$



Je třeba si všimnout, že odchylky od přímky mohou znamenat složitější model vylučování, než je kinetika prvního řádu. Pro analýzu typů vylučování, které se odchylují od kinetiky prvního řádu, mohou být použity grafické metody.

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty příjmu k_1

Při dané konstantě k_2 se k_1 vypočte takto:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_v \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(rovnice 1)}$$

Hodnota C_r se odečte ze středního bodu hladké křivky příjmu vytvořené vynesením logaritmu koncentrace proti času (v lineárním měřítku).

▼B

Počítačová metoda výpočtu rychlostních konstant příjmu a vylučování (úbytku)

Pro získání hodnoty bioakumulačního faktoru a rychlostních konstant k_1 a k_2 se dává přednost metodě nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Těmito programy se naleznou hodnoty k_1 a k_2 založené na souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích a na modelu:

$$C_r = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) 0 < t < t_c \qquad \text{(rovnice 2)}$$

$$C_r = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) t < t_c \qquad \text{(rovnice 3)}$$

kde t_c = čas konce fáze příjmu.

Tento přístup poskytuje odhady směrodatné odchylky k_1 and k_2.

Vzhledem k tomu, že ve většině případů lze odhadnout k_2 z křivky vylučování s relativně vysokou přesností, a vzhledem k tomu, že mezi těmito dvěma parametry k_1 a k_2 existuje silná korelace, jsou-li odhadovány současně, může být účelné nejdříve vypočítat k_2 pouze z údajů o vylučování a následně vypočítat k_1 z údajů příjmu nelineární regresí.

▼B

C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH

1. METODA

Tato metoda růstové zkoušky pro stanovení toxicity je replikou metody OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickým látkám na růst nedospělých ryb. Je založena na metodě pro posouzení účinků chemických látek na růst nedospělého pstruha duhového (*Oncorynchus mykiss*) při průtokových podmínkách, která byla vyvinuta v Evropské unii a testována v okružních testech (1, 3). Mohou být použity také jiné dobře popsané druhy. Byly například získány zkušenosti z růstových zkoušek s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) ([1]) (2, 4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8).

Viz také Obecný úvod, část C.

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (**Lowest Observed Effect Concentration, LOEC**): nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (**No Observed Effect Concentration, NOEC**): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

$\mathbf{EC_x}$: pro tuto metodu koncentrace zkoušené látky, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu ryb ve srovnání s kontrolami.

Velikost násady: živá hmotnost ryb v jednotce objemu vody.

Hustota obsádky: počet ryb v jednotce objemu vody.

Individuální specifická rychlost růstu ryby: vyjadřuje rychlost růstu jedince vycházející z jeho výchozí hmotnosti.

Průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž: vyjadřuje střední rychlost růstu populace v nádrži při určité koncentraci.

Pseudospecifická rychlost růstu: vyjadřuje rychlost růstu jednotlivce vycházející ze střední počáteční hmotnosti populace v nádrži.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.

▼B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Nedospělé ryby v exponenciální fázi růstu se po zvážení umístí do zkušebních nádrží a vystaví se řadě subletálních koncentrací zkoušené látky přednostně za průtokových podmínek, nebo pokud to není možné, za vhodných semistatických podmínek (statické podmínky s obnovováním média). Zkouška trvá 28 dnů. Ryby se krmí denně. Přísun potravy se řídí počáteční hmotností ryb a může být po 14 dnech nově vypočten. Na konci zkoušky se ryby opět zváží. Účinky na rychlost růstu se analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu, tj. EC_x (např. EC_{10}, EC_{20}, nebo EC_{30}). Údaje mohou být popřípadě porovnány s hodnotami pro kontrolní skupiny s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Musí být předloženy výsledky zkoušky akutní toxicity (viz zkušební metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. To znamená, že jsou známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a je k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota látky, její stálost ve vodě a na světle, pK_a, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz zkušební metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %,

— nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) musí být dostatečný na to, aby umožnil rozeznat minimální významnou změnu rychlosti růstu. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového musí střední hmotnost ryb v kontrolních skupinách vzrůst alespoň o polovinu (tj. o 50 %) jejich počáteční hmotnosti za 28 dnů; např. počáteční hmotnost: 1 g/rybu (= 100 %), konečná hmotnost po 28 dnech: ≥ 1,5 g/rybu (≥ 150 %);

— koncentrace rozpuštěného kyslíku musí dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,

— teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi lišit o více než ± 1 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v rozsahu teplot stanovených pro testovací druh (doplněk 1).

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Přístroje a pomůcky**

Normální laboratorní vybavení a zejména:

— přístroj pro stanovení kyslíku a pH-metr,

▼B

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody a alkality,

— vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování,

— nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučenému nasazování a obsádce (viz bod 1.8.5 a doplněk 1),

— dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ± 0,5 %).

1.6.2. **Voda**

Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž testovací druh dlouhodobě přežívá a roste. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ± 0,5. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako $CaCO_3$). S cílem zajistit, aby ředicí voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkoušené látky), by měly být v určitých intervalech odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky přijatelné ředicí vody jsou uvedeny v doplňku 2.

1.6.3. **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sycení kolony.

Použití rozpouštědel nebo dispergátorů (solubilizačních činidel) může být v některých případech pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky rozložitelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat s rozvahou, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na růst ryb ani viditelné nepříznivé účinky na nedospělé ryby, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla.

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být v průběhu zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je výměna vody 6 litrů na gram ryb za den přijatelná (viz bod 1.8.2.2).

U semistatických zkoušek (s obnovováním média) bude četnost obnovování média záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat vodu denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky.

1.6.4. **Výběr druhů**

Doporučeným druhem pro tuto zkoušku je pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), neboť u něj bylo v okružních testech získáno nejvíce zkušeností (1, 3). Mohou však být použity jiné dobře popsané druhy, může však být nutné v tomto případě zkušební postup upravit, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. Zkušenosti jsou například s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) (4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8). V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.5. **Chov ryb**

Testovací ryby by měly pocházet z jednoho chovu (přednostně ze stejného tření), který se alespoň dva týdny před zkouškou udržuje v podmínkách kvality vody a osvětlení, které jsou podobné podmínkám použitým ve zkoušce. V průběhu chovu a v průběhu zkoušky by měly být krmeny množstvím potravy odpovídajícím minimálně 2 % tělesné hmotnosti za den a nejlépe 4 % tělesné hmotnosti za den.

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— mortalita od 5 do 10 % populace za sedm dnů: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se přijme.

Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

▼B

1.7. USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

„Uspořádáním zkoušky“ se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet ryb v nádrži. Uspořádání by mělo být v ideálním případě zvoleno s ohledem na:

— cíl studie,

— metodu statistické analýzy, která bude použita,

— dostupnost a cenu prostředků pro experiment.

S cílem studie by měly být specifikovány pokud možno statistická významnost, s jakou má být daná velikost změny (např. změny rychlosti růstu) rozeznána, nebo přesnost, s jakou má být odhadnuta hodnota EC_x (např. při x = 10, 20 nebo 30, pokud možno ne méně než 10). Bez těchto údajů nelze stanovit přesně rozsah studie.

Je důležité vzít na vědomí, že uspořádání, které je optimální (nejlépe využívá prostředky) při použití jedné metody statistické analýzy, není nezbytně optimální pro jinou metodu. Doporučené uspořádání pro odhad LOEC/NOEC tedy nebývá stejné jako uspořádání pro analýzu regresí.

V mnoha případech se regresní analýze dává přednost před analýzou rozptylu, a to z důvodů diskutovaných Stephanem a Rogersem (9). Není-li však nalezen vhodný regresní modelfound ($r^2 < 0,9$), měla by být použito stanovení NOEC/LOEC.

1.7.1. **Uspořádání pro regresní analýzu**

Pro uspořádání zkoušky, která má být analyzována regresí, jsou důležitá tato hlediska:

— koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. $EC_{10,20,30}$) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Přesnost, s jakou mohou být odhadnuty koncentrace vyvolávající účinek, bude nejlepší, bude-li koncentrace vyvolávající účinek ležet uprostřed rozsahu zkušebních koncentrací. Předběžné orientační zkoušky mohou být užitečné při výběru vhodných zkušebních koncentrací,

— aby mohl být vytvořen uspokojivý statistický model, měla by zkouška zahrnovat alespoň jednu kontrolní nádrž a pět dalších nádrží o různých koncentracích. Popřípadě by při použití solubilizačního činidla měla být vedle zkušebních skupin nasazena jedna kontrolní skupina vystavená koncentraci solubilizačního činidla použité při nejvyšší zkušební koncentraci (viz body 1.8.3 a 1.8.4),

— může být použita vhodná geometrická nebo logaritmická řada koncentrací (10) (viz doplněk 3). Upřednostňuje se logaritmické stupňování koncentrací,

▼B

— je-li k dispozici více než šest nádrží, měly by být další nádrže použity buď pro duplicitní stanovení, nebo by měly být použity pro koncentrace rozložené v rozsahu koncentrací tak, aby se zmenšily rozestupy mezi koncentracemi. Obě použití lze doporučit stejnou měrou.

1.7.2. **Uspořádání pro odhad NOEC/LOEC analýzou rozptylu (ANOVA)**

Pro každou koncentraci by měly být nejlépe k dispozici nádrže pro duplicitní stanovení a statistická analýza by měla být provedena na úrovni nádrže (11). Bez duplicitních nádrží není možné zohlednit jinou variabilitu mezi nádržemi, než jaká je důsledkem rozdílů mezi jednotlivými rybami. Ve vyšetřovaném případě (12) se však ukázalo, že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Relativně přijatelnou alternativou je tedy provedení statistické analýzy pro jednotlivé ryby.

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2.

Provádí-li se zkouška s duplicitními nádržemi, měl by být počet duplicitních kontrolních nádrží, a tedy i počet ryb, dvojnásobkem počtu použitého pro každou zkušební koncentraci, jenž by měl být pro všechny koncentrace stejný (13, 14, 15). Nejsou-li naproti tomu duplicitní nádrže použity, měl by být v kontrolní skupině stejný počet ryb jako ve skupině pro každou zkušební koncentraci.

Je-li ANOVA založena na nádržích namísto na jednotlivých rybách (což by znamenalo buď ryby jednotlivě označit, nebo použít „pseudospecifickou“ rychlost růstu (viz bod 2.1.2)), je nezbytné počet nádrží dostatečně znásobit, aby bylo možné stanovit směrodatnou odchylku pro nádrže použité v rámci jednotlivé koncentrace. To znamená, že by měl být počet stupňů volnosti pro chybu v analýze rozptylu alespoň 5 (11). Je-li znásoben pouze počet kontrolních skupin, existuje nebezpečí, že bude zjištěná proměnlivost ovlivněna, neboť může narůstat se střední hodnotou sledované rychlosti růstu. Vzhledem k tomu, že rychlost růstu s největší pravděpodobností klesá s rostoucí koncentrací, povede to k nadhodnocení variability.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Výběr a vážení testovacích ryb**

Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 1. Rozpětí individuálních hmotností na začátku zkoušky by mělo být pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce nejlépe ± 10 % aritmetického průměru hmotností a v žádném případě by nemělo překročit 25 %. Doporučuje se zvážit před zkouškou menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti.

▼B

24 hodin před zahájením zkoušky se obsádka ryb přestane krmit. Poté se provede náhodný výběr ryb. Za použití běžného anestetika (např. vodný roztok trikain-methan-sulfonátu (MS 222) o koncentraci 100 mg/l neutralizovaný přídavkem dvou dílů hydrogenuhličitanu sodného na jeden díl MS 222) se ryby jednotlivě s přesností uvedenou v doplňku 1 zváží za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha). Ryby s hmotností v požadovaném rozsahu se náhodně rozdělí do nádrží. Zaznamená se celková živá hmotnost ryb v každé zkušební nádrži. Při manipulaci s rybami za použití anestetik (včetně osušení a zvážení) může u nedospělých ryb, a zejména u druhů o malé velikosti, dojít ke stresu a poranění. S nedospělými rybami se tedy musí manipulovat s nejvyšší opatrností, aby nedošlo u testovacích ryb ke stresu a poranění.

Ryby se opět zváží po 28 dnech zkoušky (viz bod 1.8.6). Považuje-li se však za nezbytné nově vypočítat přísun potravy, mohou být ryby opět zváženy po 14 dnech zkoušky (viz bod 1.8.2.3). Ke stanovení změn velikosti ryb, na jejichž základě se upravuje přísun potravy, může být použita jiná metoda, např. fotografická metoda.

1.8.2. **Podmínky expozice**

1.8.2.1. *Délka expozice*

Zkouška trvá 28 dnů nebo déle.

1.8.2.2. *Velikost násady a hustota obsádky*

Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky vyhovovaly použitému testovacímu druhu (viz doplněk 1). Je-li hustota obsádky příliš vysoká, dojde ke stresu vedoucímu ke snížené rychlosti růstu a popřípadě k nemocem. Je-li příliš nízká, může vyvolat teritoriální chování, což by mohlo rovněž ovlivnit růst. V každém případě by měla být velikost násady tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % ASV bez provzdušňování. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je přijatelná velikost násady 16 ryb o hmotnosti 3–5 g do objemu 40 litrů. Doporučené obnovování vody během zkoušky je 6 litrů na gram ryb za den.

1.8.2.3. *Krmení*

Ryby by měly být krmeny dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 1), aby byla umožněna přijatelná rychlost růstu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. U pstruha duhového by mělo těmto požadavkům vyhovovat množství odpovídající 4 % jejich tělesné hmotnosti za den (3, 16, 17, 18). Denní množství může být rozděleno na dva stejné díly a podáno rybám dvakrát za den s odstupem alespoň pěti hodin. Množství se řídí celkovou počáteční hmotností ryb v každé zkušební nádrži. Pokud se ryby opět zváží 14. den, množství se nově vypočte. 24 hodin před vážením se ryby přestanou krmit.

▼B

Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží každý den odstraní důkladným odsátím ze dna každé nádrže.

1.8.2.4. *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat testovacím druhům (doplněk 1).

1.8.3. **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nutných pět koncentrací zkoušené látky, a to bez ohledu na uspořádání zkoušky (viz bod 1.7.2). Předchozí znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Použije-li se méně než pět koncentrací, mělo by to být zdůvodněno. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo, neměla by být jeho konečná koncentrace vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná (viz bod 1.6.3). Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

1.8.4. **Kontrolní skupiny**

Počet kontrolních skupin v ředicí vodě závisí na uspořádání zkoušky (viz body 1.7 až 1.7.2). Použije-li se solubilizační činidlo, měl by být nasazen stejný počet kontrolních skupin se solubilizačním činidlem jako s ředicí vodou.

1.8.5. **Četnost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanoví v pravidelných intervalech (viz níže).

Při průtokových zkouškách se průtok zásobních roztoků toxické látky a ředicí vody kontroluje v určitých intervalech, přednostně denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Mají-li se koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz body 1.6.2 a 1.6.3), doporučuje se, aby byly nejnižší a nejvyšší koncentrace analyzovány alespoň na začátku zkoušky a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to stejně často jako u stálých látek.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace alespoň na začátku studie ihned po jejich přípravě a bezprostředně před obnovením a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, musí být analyzovány všechny koncentrace stejně často jako u stálejších látek.

▼B

Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace zkoušené látky v roztoku uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty nebo měřené počáteční koncentrace, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených hodnotách.

Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm nebo odstředit. Doporučuje se odstřeďování. Neadsorbuje-li se zkoušená látka na filtry, je filtrace přijatelná.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost, alkalita a popřípadě salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každé výměny vody u statických zkoušek a alespoň týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody a alkalita se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.8.6. **Pozorování**

Hmotnost: na konci každé zkoušky se musí ryby, které přežily, zvážit za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha), a to buď jako skupina pro každou zkušební nádrž, nebo jednotlivě. Vážení ryb jako skupin se upřednostňuje před vážením jednotlivých ryb, které vyžaduje, aby byly ryby jednotlivě označeny. V případě vážení jednotlivých ryb pro stanovení individuální specifické rychlosti růstu by neměla zvolená technika označení vyvolávat u ryb stres (alternativou ke značení ryb vymražením může být popřípadě použití barevného jemného rybářského vlasce).

Ryby se v průběhu zkoušky vyšetřují denně a jakékoli vnější abnormality (hemoragie, odbarvení) a neobvyklé chování se zaznamená. Každý úhyn se zaznamená a uhynulé ryby se co nejdříve odstraní. Uhynulé ryby se nenahrazují, neboť velikost násady a hustota obsádky by měly být dostatečné na to, aby nedošlo k ovlivnění růstu v důsledku změn počtu ryb v nádrži. Bude však nutné upravit množství krmiva.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, v počtu ryb atd. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

▼B

Rychlost růstu se nevypočítává pro zkušební nádrže, v nichž mortalita překročila 10 %. Velikost mortality se však uvede pro všechny zkušební koncentrace.

Bez ohledu na použitou metodu analýzy údajů je hlavním ukazatelem specifická rychlost růstu r od okamžiku t_1 do t_2. Může být definována několika způsoby v závislosti na tom, zda jsou, či nejsou ryby individuálně značeny nebo zda se požaduje průměrná hodnota pro nádrž.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde,

r_1 = individuální specifická rychlost růstu ryby,

r_2 = průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž,

r_3 = „pseudospecifická“ rychlost růstu,

w_1, w_2 = hmotnosti určité ryby v čase t_1 a t_2,

$\log_e w_1$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e w_2$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na konci vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_1$ = průměr logaritmů hodnot w_1 pro ryby v nádrži na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_2$ = průměr logaritmů hodnot w_2 pro ryby v nádrži na konci vyšetřovacího intervalu,

t_1, t_2 = čas (ve dnech) začátku a konce vyšetřovacího intervalu.

r_1, r_2, r_3 mohou být vypočteny pro interval 0–28 dnů a popřípadě (bylo-li provedeno měření 14. den) pro intervaly 0–14 a 14–28 dnů.

2.1.1. **Analýza výsledků regrese (modelování závislosti koncentrace-odezva)**

V této metodě analýzy se závislostí mezi specifickou rychlostí růstu a koncentrací proloží vhodná matematická funkce, a to umožní odhadnout „EC_x“, tj. jakoukoli požadovanou hodnotu EC. U této metody není nutný výpočet r pro jednotlivou rybu (r_1) a namísto toho se analýza může založit na průměrné hodnotě r (r_2) pro nádrž. Dává se přednost posledně uvedené metodě. Je také vhodnější při použití velmi malých druhů.

Průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (r_2) se graficky vynesou proti koncentraci, aby bylo možno zkontrolovat závislost odezvy na koncentraci.

▼B

K vyjádření závislosti r_2 na koncentraci se zvolí vhodný model; jeho volba musí být řádně zdůvodněna.

Liší-li se pro jednotlivé nádrže počty ryb, které přežily, je nutno prokládání každé závislosti, ať již jednoduché nebo nelineární, vážit s ohledem na různé velikosti skupin.

Metoda proložení modelu musí umožnit odhadnout například hodnotu EC_{20} a stanovit její rozptyl (buď směrodatnou odchylku, nebo interval spolehlivosti). Graf proložené závislosti se vynese spolu s údaji, aby byla zřejmá vhodnost použitého modelu (9, 19, 20, 21).

2.1.2. **Analýza výsledků pro odhad LOEC**

Bylo-li ve zkoušce použito pro každou koncentraci více nádrží, může být odhad LOEC založen na analýze rozptylu (ANOVA) průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (viz bod 2.1) a poté na vhodném srovnání průměrné hodnoty r pro každou koncentraci s průměrnou hodnotou r pro kontrolní skupiny (např. Dunnettovým nebo Williamsovým testem (13, 14, 15, 22)) s cílem zjistit nejmenší koncentraci, u níž je na hladině spolehlivosti 0,05 tento rozdíl významný. Nejsou-li předpoklady pro použití parametrických metod splněny, kvůli jinému než normálnímu rozdělení (např. se použije Shapiro-Wilkův test) nebo kvůli heterogennímu rozptylu (Bartlettův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA.

Nebylo-li pro každou koncentraci použito více nádrží, není použití ANOVA u jednotlivé nádrže dostatečně citlivé nebo je nemožné. v takovém případě je přijatelným kompromisem založit ANOVA na „pseudospecifické“ rychlosti růstu r_3 pro jednotlivé ryby.

Průměrná hodnota r_3 pro každou koncentraci může být poté porovnána s průměrnou hodnotou r_3 pro kontrolní skupiny. Hodnotu LOEC lze poté nalézt výše uvedeným způsobem. The LOEC can then be identified as before. Je třeba vzít na vědomí, že tato metoda neumožňuje zohlednit variabilitu mezi nádržemi ve větší míře, než s jakou se počítá v důsledku variability mezi rybami, a ani před ní nechrání. Ukázalo se však (9), že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Nejsou-li v analýze zahrnuty jednotlivé ryby, musí být uvedena metoda zjištění odlehlých hodnot a její použití musí být zdůvodněno.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky je třeba interpretovat opatrně, leží-li naměřené hodnoty koncentrací toxické látky v roztocích blízko meze stanovitelnosti analytické metody nebo klesá-li u semistatických zkoušek koncentrace zkoušené látky od okamžiku přípravy roztoku do jeho obnovení.

2.3. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼B

2.3.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

2.3.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, podle možnosti,

— kmen, velikost, původ, jakákoli příprava atd.

2.3.3. **Zkušební podmínky:**

— použitý zkušební postup (např. semistatický/s obnovováním, průtokový, nasazování, hustota obsádky atd.),

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží, zkušební koncentrace a znásobení počtu nádrží, počet ryb v nádrži),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— nominální zkušební koncentrace, průměry naměřených hodnot v jednotlivých nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené látky v pravém roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: pH, alkalita, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných pevných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

2.3.4. **Výsledky:**

— doklady o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kriteriu přežití, a údaje o mortalitě pro každou zkušební koncentraci,

— použité metody statistické analýzy, statistiky založené na znásobeném počtu nádrží nebo na jednotlivých rybách, zpracování údajů a zdůvodnění použitých metod,

— údaje ve formě tabulky o individuálních a středních hodnotách hmotností ryb v den 0, 14 (bylo-li prováděno vážení) a 28, hodnoty průměrných rychlostí růstu pro nádrž nebo popřípadě pseudospecifických rychlostí růstu pro intervaly 0–28 dnů nebo popřípadě 0–14 a 14–28 dnů,

— výsledky statistické analýzy (tj. regresní analýzy nebo ANOVA) přednostně ve formě tabulky nebo v grafické formě a hodnota LOEC ($p = 0,05$) a NOEC nebo ECx, popřípadě se směrodatnými odchylkami,

▼B

— výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou látkou.

3. LITERATURA

1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

2) Meyer, A., Bierman, C. H., Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.

3) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

4) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, str. 1855–1870.

5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, str. 157–164.

6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

7) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, str. 287–297.

8) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

9) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, str. 328–338.

10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, str. 81.

11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10–12 December 1991.

13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

▼B

14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, str. 482–491.

15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, str. 103–117.

16) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123–133.

17) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, 33–41.

18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 str.

19) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 str. 12.

22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, str. 510–531.

▼B

Doplněk 1

DRUHY RYB DOPORUČNÉ KE ZKOUŠENÍ A VHODNÉ ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Druhy	Doporučený rozsah zkušební teploty (°C)	Fotoperioda (h)	Doporučené rozpětí počáteční hmotnosti ryb (g)	Doporučená přesnost měření	Velikost násady (g/l)	Hustota obsádky (l^{-1})	Krmivo	Délka zkoušky (d)
Doporučené druhy:								
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	12,5–16,0	12–16	1–5	na 100 mg	1,2–2,0	4	značkové sušené krmivo pro mladé lososovité	≥ 28
Jiné dobře popsané druhy:								
Danio rerio danio pruhované	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–10	živé krmivo (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes halančík japonský	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–20	živé krmivo (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

DOPLNĚK 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

LÁTKA	KONCENTRACE
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyl	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

▼B

DOPLNĚK 3

Logaritmické řady koncentrací vhodných pro zkoušku toxicity (9)

Sloupec (počet koncentrací mezi 100 a 10, nebo mezi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Ze sloupců může být zvolena řada pěti (nebo více) po sobě jdoucích koncentrací. Mezilehlé body pro koncentrace ve sloupci (x) jsou uvedeny ve sloupci (2x + 1). Uvedené hodnoty mohou být koncentracemi vyjádřenými v objemových nebo hmotnostních procentech (mg/l nebo µg/l). Hodnoty mohou být podle potřeby násobeny nebo děleny jakoukoli mocninou 10. Sloupec 1 by se měl použít, pokud je úroveň toxicity značně neurčitá.

▼B

C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU

1. METODA

Tato zkouška krátkodobé toxicity je replikou metody OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku je krátkodobou zkouškou, při níž jsou exponována životní stadia od čerstvě oplodněných jiker do stadia váčkových plůdků. Při zkoušce na embryu a na váčkovém plůdku se nekrmí, a zkouška by tedy měla být ukončena, dokud je váčkový plůdek stále vyživován ze žloutkového váčku.

Zkouška je určena k zjištění letálních a v omezené míře subletálních účinků chemických látek na specifická stadia a testovací druhy. Tato zkouška by měla poskytnout užitečné informace, neboť by a) mohla být přechodem mezi letálními a subletálními zkouškami, b) mohla být použita jako screeningová zkouška pro úplnou zkoušku toxicity na raných životních stadiích nebo pro zkoušky chronické toxicity a c) mohla být použita pro zkoušení na druzích, u nichž nejsou dostatečně rozvinuty chovné techniky, aby pokryly období od endogenní výživy k exogenní.

Je třeba mít na paměti, že pouze zkoušky pokrývající celý životní cyklus ryb obecně umožňují odhadnout chronickou toxicitu chemické látky pro ryby a že jakékoli omezení expozice nějakého životního stadia může snížit citlivost, a tím podhodnotit chronickou toxicitu. Očekává se tedy, že zkouška na embryu a váčkovém plůdku je méně citlivá než úplná zkouška na raných životních stadiích, zejména pokud jde o vysoce lipofilní chemické látky (log P_{ov} > 4) a chemické látky se specifickým mechanismem toxického účinku. v citlivostech těchto dvou zkoušek se však očekávají menší rozdíly v případě chemických látek s nespecifickým, narkotickým mechanismem účinku (1).

Před publikováním této zkoušky bylo nejvíce zkušeností s touto zkouškou na embryu a váčkovém plůdku získáno u sladkovodní ryby *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – obecný název danio pruhované). Podrobnější pokyny pro zkoušku s tímto druhem jsou tedy uvedeny v doplňku 1. To nevylučuje použití jiného druhu, pro něhož jsou zkušenosti rovněž k dispozici (tabulky IA a IB).

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinkyLowest Observed Effect Concentration (LOEC): je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků No Observed Effect Concentration (NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

▼B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Rybí embrya a váčkové plůdky se vystaví rozsahu koncentrací zkoušené látky rozpuštěné ve vodě. Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním. Volba závisí na povaze zkoušené látky. Zkouška se zahájí umístěním oplodněných jiker do zkušebních nádrží a ukončí se těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku čerstvých plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Posoudí se letální a subletální účinky a porovnají se s hodnotami kontrolních skupin s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky, a tedy koncentraci bez pozorovaných účinků. Mohou být popřípadě analyzovány za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek (tj. LC/ECx, kde x je definovaný procentuální účinek).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být dostupné výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. Výsledky mohou být užitečné při výběru vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkoušce na raných životních stadiích. Měly by být známy rozpustnost látky ve vodě (včetně rozpustnosti ve zkušební vodě) a tlak par látky. Měla by být k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkoušených roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek jsou strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, pKa, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách a podle potřeby v nádržích, do nichž bylo přidáno pouze rozpouštědlo, musí být rovna limitům stanoveným v dodatcích 2 a 3 nebo vyšší,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku musí ležet mezi 60 a 100 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,

— teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi nebo mezi dny, které po sobě následují, lišit o více než ± 1,5°C a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro testovací druh (dodatky 2 a 3).

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební nádrže**

Mohou být použity jakékoli nádrže ze skla nebo z jiného inertního materiálu. Rozměry zkušebních nádrží by měly být dostatečné k tomu, aby vyhovovaly velikosti násady (viz bod 1.7.1.2). Doporučuje se, aby byly nádrže umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Uspořádání do náhodných bloků se zastoupením všech variant expozice v každém bloku se upřednostňuje před zcela náhodným uspořádáním, kdy existují systémové účinky v laboratoři, které mohou být blokovým uspořádáním kontrolovány. Je-li použito blokové uspořádání, mělo by být zohledněno při následné analýze údajů. Nádrže by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy.

1.6.2. **Výběr druhů ryb**

Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v tabulce 1A. To nevylučuje použití jiného druhu (příklady jsou uvedeny v tabulce 1B), avšak zkušební postup musí být upraven tak, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.3. **Chov matečných ryb**

Podrobnosti o chovu matečných ryb v uspokojivých podmínkách jsou uvedeny v metodě OECD TG 210 ([1]) a v odkazech (2, 3, 4, 5, 6).

1.6.4. **Chov embryí a plůdků**

Embrya a plůdky mohou být exponovány v hlavní nádrži v menších nádobách s pletivovými stěnami nebo konci, aby jimi mohl proudit zkušební roztok. Nevířivého průtoku nádobami lze dosáhnout jejich zavěšením do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny; lze rovněž použít systém sifonového průtoku. Oplodněné jikry lososovitých ryb mohou ležet na podložce nebo pletivu s dostatečně velkými oky, aby jimi mohly plůdky po vylíhnutí propadnout. K přemístění embryí a plůdků v semistatické zkoušce s každodenní úplnou výměnou média je vhodné použít odsávačky (viz bod 1.6.6).

Jsou-li k udržení jiker v hlavní nádrži použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny ([1]), pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku ryb. Je-li třeba přemístit plůdky, neměly by být vystaveny vzduchu a neměly by se k jejich vytažení z nádob používat síťky (taková opatrnost není nutná u méně křehkých druhů, např. u kapra). Okamžik přemístění se liší podle druhu a přemístění nemusí být vždy nutné. U semistatických technik mohou být použity kádinky nebo mělké nádobky a podle potřeby mohou být opatřeny sítem umístěným nepatrně nad dnem kádinky. Je-li objem těchto nádob dostatečný, aby vyhovoval požadavkům na nasazování (viz bod 1.7.1.2), nemusí být přemístění embryí nebo plůdků nutné.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

▼B

1.6.5. **Voda**

Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přijatelné ředicí vody, jak jsou uvedeny v dodatku 4, a v níž testovací druhy kontrolních skupin přežívají alespoň tak, jak je uvedeno v dodatcích 2 a 3. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by se neměla měnit o více než ± 0,5. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

1.6.6. **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony. Neměla by být používána rozpouštědla nebo dispergátory (solubilizační činidla), v některých případech však může být použití takových látek pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na raná životní stadia, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

U semistatických technik mohou být použity dva různé postupy obměny; buď i) se do čistých nádob připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se s malým objemem starého roztoku opatrně přemístí do nových nádob, aniž by se vystavily vzduchu, nebo ii) se testovací organismy ponechají v nádobě a vymění se určitý podíl (alespoň tři čtvrtiny) zkušební vody. Četnost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat médium denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky. V každém případě je třeba dbát na to, aby plůdky nebyly při obnovování vody vystaveny stresu.

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Jako vhodný byl shledán průtok odpovídající výměně alespoň pětinásobku objemu nádrže za 24 hodin (2).

1.7. POSTUP

Užitečné informace o provádění zkoušek toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku jsou dostupné v literatuře, přičemž některé literární zdroje jsou uvedeny v tomto textu v oddílu s literaturou (7, 8, 9).

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Délka expozice*

Zkouška se zahájí přednostně do 30 minut po oplodnění jiker. Embrya se ponoří do zkušebního roztoku před započetím rýhování blastuly nebo co nejdříve po něm, a v každém případě před počátkem stadia gastruly. U jiker získaných od komerčního dodavatele nemusí být možné zahájit zkoušku ihned po oplodnění. Vzhledem k tomu, že citlivost zkoušky může být vážně ovlivněna zpožděním začátku zkoušky, měla by být zkouška zahájena do osmi hodin po oplodnění. Vzhledem k tomu, že se plůdky v průběhu expozice nekrmí, ukončí se zkouška těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku u některého plůdku v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Délka zkoušky bude záviset na použitém druhu. Některé doporučené délky zkoušky jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3.

1.7.1.2. *Nasazování*

Počet oplodněných jiker na začátku zkoušky by měl dostatečný ke splnění statistických požadavků. Měly by být náhodně rozděleny mezi varianty expozice a na jednu koncentraci by mělo být rozděleno alespoň 30 jiker rovným dílem (nebo alespoň tak, jak je to možné s ohledem na to, že u některých druhů může být obtížné získat stejně velké podíly) mezi alespoň tři zkušební nádrže. Velikost násady (biomasa v jednotce objemu) by měla být tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % hodnoty ASV bez provzdušňování. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřekračující 0,5 g/l za 24 hodin a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota zkušební vody by měly vyhovovat testovacím druhům (dodatky 2 a 3). Pro účely sledování teploty může sloužit další zkušební nádrž.

▼B

1.7.2. **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nezbytných pět koncentrací zkoušené látky lišících se od sebe konstatním faktorem nepřekračujícím 3,2. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měla být zohledněna křivka závislosti hodnoty LC_{50} na délce expozice ve studii akutní toxicity. Za určitých okolností může být oprávněné použít méně než pět koncentrací, např. v limitní zkoušce, a užší rozsah koncentrací. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Koncentrace látky, které jsou vyšší než 96hodinová LC_{50} nebo vyšší než 100 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušební vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo (viz bod 1.6.6), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádrži vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná.

1.7.3. **Kontrolní skupiny**

Jako další zkušební sady by měly být nasazeny kontrolní skupina v ředicí vodě (příslušným způsoben znásobená) a podle potřeby také jedna kontrolní skupina se solubilizačním činidlem (příslušným způsoben znásobená).

1.7.4. **Četnost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek, u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz bod 1.4 a 1.6.6), se doporučuje analyzovat nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie, ihned po jejich přípravě, a bezprostředně před obnovením, a to alespoň třikrát ve stejných intervalech v průběhu celé doby zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – ihned po jeho přípravě a při jeho obnovení).

U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a před jejich výměnou, a to stejně často (tj. alespoň ve třech okamžicích rovnoměrně rozložených na celou dobu zkoušky). Stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením je třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádrže. Stanovení se provádějí v odstupu ne více než 7 dnů. Doporučuje se, aby výsledky byly založeny na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách.

Pro průtokové zkoušky je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Je-li však zkouška delší než sedm dnů, doporučuje se zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé.

▼B

Může být nezbytné vzorky odstředit nebo filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm). Vzhledem k tomu, že však odstředění ani filtrace vždy neoddělí od sebe biologicky dostupný a biologicky nedostupný podíl zkoušené látky, nemusí být vzorky takto zpracovány.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost a salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každého období mezi výměnami vody u semistatických zkoušek a alespoň jednou týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří denně a přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.7.5. **Pozorování**

1.7.5.1. *Stadia vývoje embrya*

Embryonální stadium (tj. stadium gastruly) na začátku expozice zkoušené látce by mělo být identifikováno co nejpřesněji. Lze to provést za použití reprezentativního vzorku vhodně uchovávaných a očištěných jiker. Popis a vyobrazení embryonálních stadií lze také nalézt v literatuře (2, 5, 10, 11).

1.7.5.2. *Líhnutí a přežívání*

Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Může být žádoucí provádět na začátku zkoušky častější pozorování (např. každých 30 minut během prvních tří hodin), neboť v některých případech mohou být důležitější doby přežití než pouhé počty úhynů (např. dochází-li k akutním toxickým účinkům). Uhynulá embrya a plůdky se odstraní ihned po nalezení, neboť se mohou rychle rozkládat. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se nenarazilo do sousedních jiker/plůdků nebo aby se fyzicky nepoškodily, neboť jsou mimořádně křehké a citlivé. Kritéria uhynutí se u životních stadií liší:

— u jiker: zejména v raných stadiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolaná koagulací a/nebo sražením bílkovin, které vedou k bílému zakalení,

— u embryí: absence pohybu nebo tepu srdce nebo neprůsvitné zbarvení u druhů, jejichž embrya jsou za normálních okolností průsvitná,

— u plůdků: nepohyblivost nebo absence dýchacích pohybů nebo tepu srdce nebo bílé neprůsvitné zbarvení centrálního nervového systému a nedostatečná reakce na mechanické podněty.

▼B

1.7.5.3. *Neobvyklý vzhled*

Počet plůdků vykazujících neobvyklý tělesný vzhled nebo pigmentaci a stav absorpce žloutkového váčku se zaznamenávají v přiměřených intervalech závisejících na délce zkoušky a na povaze popisované abnormality. Je třeba si uvědomit, že se neobvyklá embrya a plůdky přirozeně vyskytují a u některých druhů jich může být v kontrolních skupinách řádově několik procent. Neobvyklí jedinci by měli být ze zkušební nádrže odstraněni pouze v případě uhynutí.

1.7.5.4. *Neobvyklé chování*

Abnormality, např. hyperventilace, nekoordinované plavání a netypická nečinnost, se zaznamenávají v přiměřených intervalech závisejících na délce zkoušky. Tyto účinky, přestože je obtížné je kvantifikovat, mohou – jsou-li pozorovány – napomoci interpretovat údaje o mortalitě, tj. mohou poskytnout informace o mechanismu toxického působení látky.

1.7.5.5. *Tělesná délka*

Doporučuje se změřit na konci zkoušky individuální délky; může být použita standardní délka, délka k vidlici nebo celková délka. Došlo-li však k uhnití ocasní ploutve nebo k erozi ploutví, použijí se standardní délky. Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro délku mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Hmotnost*

Na konci zkoušky lze stanovit hmotnosti jedinců; hmotnost po vysušení (24 hodin při 60 °C) se upřednostňuje před živou váhou (po osušení do sucha).Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro hmotnost mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

Tato pozorování poskytnou některé nebo všechny následující údaje, které budou k dispozici pro statistickou analýzu:

— kumulativní mortalita,

— počty zdravých plůdků na konci zkoušky,

— čas začátku líhnutí a konce líhnutí (tj. 90 % vylíhnutí v každé paralelní skupině),

— počty plůdků vylíhnutých každý den,

— délka (a hmotnost) ryb, které přežily do konce zkoušky,

— počty plůdků, které jsou deformované nebo mají neobvyklý vzhled,

— počty plůdků vykazujících neobvyklé chování.

▼B

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, ve výchozím počtu oplodněných jiker a v měřených parametrech. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

Mají-li být odhadnuty hodnoty LOEC/NOEC, bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady paralelních skupin pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) nebo pomocí kontingenční tabulky. k vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny může být užitečný Dunnettův test (12, 13). K dispozici jsou další užitečné příklady (14, 15). Vypočte se a uvede velikost účinku, zjištěná pomocí analýzy ANOVA nebo jiných metod (tj. vypovídací schopnost zkoušky). Je třeba si uvědomit, že ne všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6 jsou vhodná pro statistickou analýzu pomocí ANOVA. Například kumulativní mortalita a počet zdravých plůdků na konci zkoušky by mohly být analyzovány probitovými metodami.

Mají-li být odhadnuty LC nebo EC_x, proloží se údaji vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logistická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka nebo křivky by měly být popsány parametry tak, aby bylo možné přímo odhadnout požadované hodnoty LC nebo EC_x a jejich směrodatné odchylky. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnoty LC nebo EC_x. Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uvede se oboustranný 95 % interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. Proložení lze provést graficky. Regresní analýza je vhodná pro všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace toxické látky ve zkušebních roztocích pohybují na úrovních blízkých mezi stanovení analytické metody. Interpretace výsledků pro koncentrace vyšší, než je rozpustnost látky ve vodě, by měla být rovněž opatrná.

2.3. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.3.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

▼B

2.3.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, kmen, počet matečných ryb (tj. kolik samiček bylo ve zkoušce použito pro získání požadovaného počtu jiker), zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

2.3.3. **Zkušební podmínky:**

— použitá zkušební metoda (např. semistatická nebo průtoková metoda, doba od oplodnění do začátku zkoušky, nasazování atd.),

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží a jejich znásobení, počet embryí v nádrži),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— nominální zkušební koncentrace, naměřené hodnoty ve zkušebních nádržích, jejich střední hodnoty a směrodatné odchylky a metody jejich stanovení, a je-li zkoušená látka rozpustná ve vodě v koncentracích nižších, než jsou vyšetřované koncentrace, uvede se důkaz toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentraci zkoušené látky v roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku.

2.3.4. **Výsledky**

— výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily obecné požadavky na přijatelnou míru přežití pro testovací druh (dodatky 2 a 3),

— údaje o mortalitě nebo přežití v embryonálním stadiu a ve stadiu plůdku a údaje o celkové mortalitě nebo přežití,

— doba do vylíhnutí, počty vylíhnutých jedinců,

— údaje o délce (a hmotnosti),

— výskyt a popis morfologických odchylek, vyskytly-li se,

— výskyt a popis účinků na chování, vyskytly-li se,

— statistická analýza a zpracování údajů,

— u zkoušek analyzovaných pomocí ANOVA nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na hladině spolehlivosti $p = 0,05$ a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odezvu, včetně popisu použité statistické metody a údaje o tom, jak velký účinek bylo možné zjistit,

▼B

— u zkoušek analyzovaných pomocí regresních metod, hodnoty LC a ECx a intervaly spolehlivosti a graf proložené závislosti použité pro jejich výpočet,

— vysvětlení jakékoli odchylky od této zkušební metody.

3. **LITERATURA**

1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, str. 60. June 1990.

2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 str.

3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121–173.

6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, str. 328–330.

7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, str. 61–71.

8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, str. 807–821.

9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129–145.

10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 str.

12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, str. 321–334.

16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, str. 81.

17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126–134.

18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252; 231-236.

19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19–28.

20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189–1203.

23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 str.

25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, str. 1–58.

Tabulka 1A

Druhy ryb doporučené pro zkoušku

SLADKOVODNÍ
Oncorhynchus mykiss
pstruh duhový (9, 16)
Danio rerio
danio pruhované (7, 17, 18)
Cyprinus caprio
kapr obecný (8, 19)
Oryzias latipes
halančík japonský (20, 21)
Pimephales promelas
střevle (8, 22)

▼B

Tabulka 1B

Příklady dalších dobře popsaných druhů, které byly rovněž použity

SLADKOVODNÍ	MOŘSKÉ
Carassius auratus karas zlatý (8)	*Menidia peninsulae* (23, 24, 25)
Lepomis macrochirus slunečnice modrá (8)	*Clupea harengus* (24, 25) *Gadus morhua* (24, 25) *Cyprinodon variegatus* (23, 24, 25)

▼B

DODATEK 1

NÁVOD K PROVEDENÍ ZKOUŠKY TOXICITY NA EMBRYÍCH A VÁČKOVÝCH PLŮDCÍCH DANIA PRUHOVANÉHO *(BRACHYDANIO RERIO)*

ÚVOD

Danio pruhované pochází z indického pobřeží Coromandel, kde žije v bystřinách. Je běžnou akvarijní rybou z čeledi kaprovitých a informace o péči o něj a o jeho chovu jsou uvedeny v standardních příručkách o tropických rybách. Přehled jeho biologie a použití ve výzkumu ryb podává Laale (1).

Ryba zřídka dorůstá délky více než 45 mm. Má válcové tělo se 7–9 horizontálními tmavě modrými stříbřitými pruhy. Pruhy pokračují přes ocasní a řitní ploutve. Hřbet má olivově zelený. Samečci jsou štíhlejší než samičky. Samičky jsou stříbrnější a mají rozšířené břicho, zejména před třením.

Dospělé ryby dokážou snášet velké kolísání teploty, pH a tvrdosti vody. Mají-li se však získat zdravé ryby poskytující jikry dobré kvality, měly by být zajištěny optimální podmínky.

Při tření sameček sleduje samičku a doráží na ni a při vypuzení jiker je oplodní. Jikry, které jsou průsvitné a nejsou přilnavé, dopadají na dno, kde mohou být pozřeny rodiči. Na tření má vliv světlo. Při odpovídajícím ranním světle se ryby třou v prvních hodinách po rozednění.

Samička může klást v odstupu jednoho týdne dávky o několika stech jiker.

PODMÍNKY PRO MATEČNÉ RYBY, REPRODUKCE A RANÁ ŽIVOTNÍ STADIA

Vybere se vhodný počet zdravých ryb, které se alespoň dva týdny před předpokládaným třením udržují ve vhodné vodě (např. dodatek 4). Skupina ryb by měla mít možnost se před kladením jiker pro zkoušku alespoň jednou vytřít. Hustota obsádky ryb by v tomto období neměla přesáhnout 1 gram ryb na litr. Pravidelná výměna vody nebo použití přečišťovacího systému umožní hustotu zvýšit. Teplota v chovných nádržích se má udržovat na 25 ± 2 °C. Ryby by měly dostávat rozmanitou potravu, která může obsahovat například komerční suché krmivo, čerstvě vylíhnuté žábronožky (Arthemia), chironomidy, dafnie, bílé červy roupice (Enchytraeids).

Dále jsou uvedeny dvě metody, které v praxi vedly k dostatečnému množství zdravých oplodněných jiker pro provedení zkoušky:

i) Osm samiček a 16 samečků se umístí do nádrže obsahující 50 litrů ředicí vody a chráněné před přímým světlem a ponechá se alespoň 48 hodin co nejvíce v klidu. Na dno nádrže se odpoledne v den před započetím zkoušky umístí vytírací rošt. Vytírací rošt se skládá z 5–7 cm vysokého rámu (z plexiskla nebo jiného vhodného materiálu) s 2–5 cm hrubým roštem nahoře a s 10–30 μm jemným roštem vespod. Na hrubém roštu je připevněna řada vytíracích střapců pro kladení jiker z nekrouceného silonového vlákna. Poté, co byly ryby drženy 12 hodin v temnu, se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Dvě až čtyři hodiny po vytření se vytírací rošt vyjme a jikry se seberou. Vytírací rošt zabrání rybám v požírání jiker a zároveň umožní snadný sběr jiker. Skupina ryb by se měla před třením určeným k produkci jiker pro zkoušku vytřít alespoň jednou.

▼B

ii) Pět až deset samečků a samiček se alespoň dva týdny před zamýšleným třením chová odděleně. Po 5 až 10 dnech se břicha samiček rozšíří a zviditelní se jejich genitální papily. Samečci papily nemají. Tření se provede v nádržích pro tření opatřených falešným dnem z pletiva (jako výše). Nádrž se naplní ředicí vodou tak, aby voda sahala 5–10 cm nad dno. Jedna samička a dva samečci se umístí do nádrže den před zamýšleným třením. Teplota vody se postupně zvýší jeden stupeň nad aklimatizační teplotu. Vypne se osvětlení a nádrž se ponechá co nejvíce v klidu. Ráno se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Po 2–4 hodinách se ryby vyjmou a jikry se seberou. Je-li potřeba více dávek jiker, než lze získat od jedné samičky, nasadí se paralelně dostatečný počet nádrží pro tření. Zaznamenáním úspěšnosti (množství a kvality) reprodukce jednotlivých samiček před zkouškou lze vybrat pro chov samičky s nejvyšší úspěšností.

Jikry se přenesou do zkušební nádrže skleněnou trubičkou (o vnitřním průměru ne menším než 4 mm) opatřenou pružným nasávacím balónkem. Množství vody, které se přenáší s jikrami, by mělo být co nejmenší. Jikry jsou těžší než voda a z trubičky vypadnou. Je třeba zabránit tomu, aby jikry (a plůdky) přišly do kontaktu se vzduchem. Provede se mikroskopické vyšetření vzorku (vzorků) jiker, aby se ověřilo, že v prvních stadiích vývoje nedošlo k nepravidelnostem. Dezinfekce jiker není přípustná.

Mortalita jiker je nejvyšší během prvních 24 hodin po oplodnění. V této době je často pozorována mortalita 5–40 %. Jikry degenerují v důsledku neúspěšného oplodnění nebo vývojových vad. Zdá se, že kvalita jiker závisí na samičce, neboť některé samičky soustavně kladou jikry dobré kvality, jakou jiné samičky neposkytují. Rovněž rychlost vývoje a líhnutí se mezi jednotlivými soubory liší. Úspěšně oplodněné jikry a plůdky se žloutkovým váčkem přežívají dobře, obvykle jich přežívá více než 90 %. Při 25 °C se z jiker líhnou jedinci po 3–5 dnech po oplodnění a žloutkový váček je absorbován přibližně po 13 dnech po oplodnění.

Embryonální vývoj byl dobře definován Hisaokou a Battlem (2). Díky průsvitnosti jiker a plůdků čerstvě po vylíhnutí lze vývoj ryb dobře sledovat a lze pozorovat malformace. Přibližně čtyři hodiny po vytření lze rozlišit neoplodněné jikry od oplodněných (3). K tomuto vyšetření se jikry a plůdky umístí do nádobky o malém objemu a prohlížejí se pod mikroskopem.

Zkušební podmínky požadované pro raná životní stadia jsou uvedeny v dodatku 2. Optimální hodnoty pH a tvrdosti vody jsou 7,8 a 250 mg/l, vyjádřeno jako $CaCO_3$.

VÝPOČTY A STATISTIKA

Navrhuje se dvoufázový postup. V první fázi se statisticky analyzují údaje o mortalitě, nenormálním vývoji a době líhnutí. Poté se pro ty koncentrace, při nichž nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na tyto parametry, statisticky vyhodnotí tělesná délka. Tento postup se doporučuje, neboť toxická látka může selektivně usmrcovat menší ryby, prodlužovat dobu líhnutí a indukovat viditelné malformace, a tedy zkreslovat výsledky měření délky. Kromě toho tak bude pro každou expozici měřen zhruba stejný počet ryb, čímž se zajistí validita statistiky zkoušky.

▼B

STANOVENÍ LC_{50} A EC_{50}

Procento přežití jiker a plůdků se vypočte a zkoriguje na mortalitu v kontrolních skupinách podle Abbottovy rovnice (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

kde,

P = korigované procento přežití,

P' = procento přežití pozorované ve zkoušené koncentraci,

C = procento přežití v kontrolní skupině.

Podle možnosti se vhodnou metodou stanoví hodnota LC_{50} na konci zkoušky.

Požaduje-li se, aby byly do statistiky pro EC_{50} zahrnuty morfologické odchylky, lze k tomu nalézt návod v práci Stephana (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Cílem zkoušky na jikrách a váčkových plůdcích je porovnat koncentrace, u nichž nebyl účinek nulový, s kontrolními skupinami, tj. stanovit LOEC. Použijí se tedy metody vícenásobného srovnání (6, 7, 8, 9, 10).

LITERATURA

1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121–173.

2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, str. 311.

3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, str. 173–181.

4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, str. 1–333.

5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, str. 69–81.

6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, str. 103–117.

9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, str. 519–531.

10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

DODATEK 2

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní								
Brachydanio rerio Danio pruhovaný	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Pokud možno ihned od oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8–10 dnů)	80	90
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50–55 dnů)	66	70
Cyprinus carpio kapr obecný	21–25	—	12–16	5	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	80	75
Oryzias latipes halančík japonský	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13–16 dnů)	80	80
Pimephales promelas střevle	25 ± 2	—	16	4–5	5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	60	70

(1) Pro embrya.
(2) Pro plůdky.
(a) Temno pro embrya a plůdky do jednoho týdne po vylíhnutí, s výjimkou doby prohlídky. Poté po dobu zkoušky tlumené světlo.

DODATEK 3

Zkušební podmínky, délka zkoušky a kritéria přežití pro jiné dobře popsané druhy

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní								
Carassius auratus karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 — 4	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	80
Leopomis macrochirus slunečnice modrá	21 ± 1	—	16	3	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	75
Mořský								
Menidia peninsulae	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (6–7 dnů)	80	60
Clupea harengus Sleď obecný	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (23–27 dnů)	60	80
Gadus morhua Treska obecná	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (18 dnů)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15 – 30	12	–	—	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4/7 dnů po vylíhnutí (28 dnů)	> 75	80

▼B

DODATEK 4

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrace
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 μg/l
Zbytkový chlor	< 10 μg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

▼B

C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU

1. METODA

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 213 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení orální akutní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní orální toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná. Zkouška akutní orální toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. The results of this test should be used to define the need for further evaluation. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušebního postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní orální toxicita: jsou nepříznivé účinky, ke kterým dojde nejpozději do 96 hodin od orálního podání jediné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství požité zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu). Skutečnou dávku u každé včely nelze vypočítat, neboť se včely krmí vzájemně, lze však odhadnout průměrnou dávku (celkově odebrané množství zkoušené látky dělené počtem včel v jedné klícce).

LD_{50} (střední letální dávka) orálně je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po orálním podání způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů muže být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozptýlené v cukerném roztoku. Včely jsou poté krmeny stejným roztokem neobsahujícím zkoušenou látku. Mortalita se zaznamenává denně během alespoň 48 hodin a porovnává se s kontrolními hodnotami. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. $\leq$ 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD_{50} pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,

— LD_{50} pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. **Sběr včel**

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylíhnout v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatóze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozivzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo jednorázově použitelné dřevěné klícky atd. Dává se přednost skupinám po 10 včelách. Velikost zkušebních klícek by měla vyhovovat počtu včel, tj. měla by poskytovat dostatek prostoru.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V). Po podání zkušebních dávek se podává potrava *ad libitum*. Systém krmení by měl umožňovat zaznamenání příjmu potravy pro každou klícku (viz bod 1.6.3.1). Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. **Příprava včel**

Sesbírané včely se náhodně umístí do klícek, které se náhodně rozmístí v experimentální místnosti.

▼B

Před začátkem zkoušky mohou včely až 2 hodiny hladovět. Doporučuje se, aby nebyla včelám před expozicí podávána potrava, aby byly na začátku zkoušky rovnocenné, pokud jde o obsah zažívacího ústrojí. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. **Příprava dávek**

Je-li zkoušená látka mísitelná s vodou, může být rozptýlena přímo v 50 % cukerném roztoku. U technických přípravků a látek s nízkou rozpustností ve vodě mohou být použity nosiče, jako jsou organická rozpouštědla, emulgátory nebo dispergátory s nízkou toxicitou pro včely (např. aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Koncentrace nosiče závisí na rozpustnosti zkoušené látky a měla by být stejná pro všechny zkušební koncentrace. Obecně je vhodná 1 % koncentrace nosiče a neměla by být překračována.

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: roztok ve vodě a cukerný roztok s rozpouštědlem/nosičem v koncentraci použité v dávkování.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50}. Faktor ředění a počet koncentrací pro dávkování se však stanoví s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné koncentrace pro dávkování je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách. Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Nasadí se také zkušební skupiny pro použitá rozpouštědla nebo nosiče (viz bod 1.5.4).

1.6.2. **Standard toxicity**

Do sérií zkoušení se zařadí standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD_{50}. Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klícky po deseti včelách, tj. tři opakování. Přednostním standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD_{50} 24 hodin, orálně v rozmezí 0,10–0,35 μg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozice**

1.6.3.1. *Podávání dávek*

Každé zkušební skupině včel se musí poskytnout 100–200 µl 50 % vodného cukerného roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci. Větší objem je nezbytný u látek s nízkou rozpustností, nízkou toxicitou nebo nízkou koncentrací ve formulaci, neboť v cukerném roztoku musí být použit větší podíl. Sleduje se množství potravy se zkoušenou látkou odebrané zkušební skupinou. Po spotřebování potravy (obvykle do 3–4 hodin) se z klícky odebere krmítko a nahradí se krmítkem obsahujícím pouze cukerný roztok. Cukerný roztok se poté poskytne *ad libitum*. Vysoké koncentrace některých sloučenin mohou působit odpudivě. To má za následek, že je přijímámo málo potravy, nebo že se žádná potrava neodebere. Po maximálně 6 hodinách se nespotřebovaná potrava se zkoušenou látkou nahradí samotným cukerným roztokem. Stanoví se množství spotřebované potravy se zkoušenou látkou (např. měřením objemu nebo zvážením neodebrané potravy).

1.6.3.2. *Délka trvání zkoušky*

Upřednostňuje se délka trvání zkoušky 48 hodin od okamžiku, kdy byl zkušební roztok nahrazen samotným cukerným roztokem. Jestliže se mortalita po prvních 24 hodinách zvyšuje o více než 10 %, zkouška se prodlouží maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekročí 10 %.

1.6.4. **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od zahájení zkoušky a poté po 24 hodinách a 48 hodinách (rozumí se po podání dávky). Je-li nezbytné pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Odhadne se množství spotřebované potravy na jednu skupinu. Porovnáním rychlostí spotřebování potravy se zkoušenou látkou a bez ní lze získat informaci o chutnosti potravy se zkoušenou látkou.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD_{50} je vyšší než tato hodnota. Při ní se postupuje stejným způsobem, tj. nasadí se tři souběžné zkušební skupiny pro každou zkušební dávku, odpovídající kontrolní skupiny, stanoví se množství spotřebované potravy s účinnou látkou a použije se standard toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). Pokud nebyla potrava se zkoušenou látkou zcela odebrána, stanoví se spotřebovaná dávka zkoušené látky na skupinu. LD_{50} se vyjádří v μg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální stav a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),

— údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,

— informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

2.2.3. **Zkušební podmínky:**

— teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,

— podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klícek,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků (je-li použito, uvede se rozpouštědlo a jeho koncentrace),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito rozpouštědlo, musí být uvedeno, včetně koncentrace), uspořádání zkoušky, např. použité zkušební koncentrace a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou koncentraci a kontrolu počet paralelních klícek a počet včel na klícku,

— datum zkoušky.

▼B

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,

— nekorigované údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každé době pozorování,

— graf křivek závislosti dávka-reakce na konci zkoušky,

— hodnoty LD_{50} intervaly spolehlivosti pro každý doporučený čas pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,

— statistické metody použité pro stanovení LD_{50},

— mortalita v kontrolních skupinách,

— jiné pozorované nebo naměřené biologické účinky, např. neobvyklé chování včel (včetně odmítnutí zkušební dávky), rychlost odebírání potravy v exponovaných a neexponovaných skupinách,

— jakákoli odchylka od zde popsaného zkušebního postupu a jiné důležité informace.

3. **LITERATURA**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol.,18, 265–267.

▼B

C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY

1. METODA

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení akutní kontaktní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní kontaktní toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná. Zkouška akutní kontaktní toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušebního postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní kontaktní toxicita: je nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 hodin od topikální aplikace jedné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství aplikované zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu).

LD_{50} (střední letální dávka) kontaktně: je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po kontaktní aplikaci způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů muže být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozpuštěné ve vhodném nosiči přímou aplikací na torax (jako kapičky). Zkouška trvá 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. < 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Mortalita se zaznamenává denně a porovnává se s kontrolními hodnotami. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD_{50} pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,

— LD_{50} pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. **Sběr včel**

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylíhnout v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatóze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozivzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo dřevěné klícky na jednorázové použití atd. Velikost zkušebních klícek by měla vyhovovat počtu včel, tj. klícky by měly poskytovat dostatek prostoru. Dává se přednost skupinám po 10 včelách.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V) a podává se za použití krmítka včel po dobu zkoušky *ad libitum*. Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. **Příprava včel**

Sesbírané včely mohou být za účelem aplikace zkoušené látky narkotizovány oxidem uhličitým nebo dusíkem. Množství anestetika v době expozice by mělo být minimalizováno. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. **Příprava dávek**

Zkoušená látka se aplikuje jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle nebo jako vodný roztok se smáčedlem. Jako organické rozpouštědlo se upřednostňuje aceton, mohou však být použita i jiná rozpouštědla s nízkou toxicitou pro včely (např. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). U finálně upravených přípravků dispergovaných ve vodě a u silně polárních organických látek nerozpustných v organických nosičových rozpouštědlech lze aplikaci usnadnit jejich rozpuštěním ve slabém roztoku komerčního smáčedla (např. smáčedla Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: jedna ošetřená vodou a jedna rozpouštědlem/dispergátorem.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50}. Počet dávek se však musí stanovit s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách.

Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Je-li použito organické rozpouštědlo nebo smáčedlo, musí se zařadit další tři kontrolní skupiny po 10 včelách pro rozpouštědlo a smáčedlo.

1.6.2. **Standard toxicity**

V rámci zkušebních skupin musí být použit standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD_{50}. Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klícky po deseti včelách, tj. tři opakování. Upřednostňovaným standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD_{50} 24 hodin, kontaktně v rozmezí 0,10–0,30 μg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

1.6.3. **Expozice**

1.6.3.1. *Podávání dávek*

U narkotizovaných včel se jednotlivě provede topikální aplikace. Včely se náhodně rozdělí do různých zkušebních a kontrolních skupin. Objem 1 μl roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci se aplikuje mikroaplikátorem na dorsální stranu thoraxu každé včely. Mohou být použity i jiné objemy, je-li to opodstatněné. Po aplikaci se včely umístí do zkušebních klícek a zásobí se cukerným roztokem.

1.6.3.2. *Délka doby trvání zkoušky*

Upřednostňuje se délka doby trvání zkoušky 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje o více než 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje $\leq$ 10 %.

▼B

1.6.4. **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od aplikace a poté po 24 hodinách a 48 hodinách. Je-li nezbytné dobu pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 μg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD_{50} je vyšší než tato hodnota. Postupuje se stejným způsobem, včetně nasazení tří souběžných zkušebních skupin pro každou zkušební dávku, tj. tří opakování, odpovídajících kontrolních skupin a použití standardu toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování (tj. 24 hodin, 48 hodin a podle potřeby 72 hodin, 96 hodin) a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). LD_{50} se vyjádří v μg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální stav a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),

— údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,

— informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

▼B

2.2.3. **Zkušební podmínky:**

— teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,

— podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klícek,

— metody aplikace zkoušené látky, např. použité nosičové rozpouštědlo, aplikovaný objem zkušebního roztoku, použitý narkotizační prostředek,

— uspořádání zkoušky, např. použité zkoušené dávky a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou dávku a kontrolu počet paralelních klícek, tj. opakování, a počet včel na klícku,

— datum zkoušky.

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,

— primární údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každém čase pozorování,

— graf křivek závislosti dávkareakce na konci zkoušky,

— hodnoty LD_{50} s 95 % intervaly spolehlivosti pro každou doporučenou dobu pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,

— statistické metody použité pro stanovení LD_{50},

— mortalita v kontrolních skupinách,

— jiné pozorované nebo změřené biologické účinky a jakékoli neobvyklé reakce včel,

— jakákoli odchylka od zde popsaného zkušebního postupu metody a jiné důležité informace.

3. **LITERATURA**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March, 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22, 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265–267.

▼B

C.18. **STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU**

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 106 pro stanovení půdní adsorpce/desorpce šaržovitou rovnovážnou metodou (2000).

1.1. ÚVOD

Tato metoda se opírá o okružní testy a seminář o výběru půd pro vývoj zkoušky adsorpce (1, 2, 3, 4) a rovněž o existující metodiky na vnitrostátní úrovni (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Studie adsorpce/desorpce jsou užitečné pro získávání důležitých informací o mobilitě a distribuci chemických látek v půdních, vodních a vzdušných složkách biosféry (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Informace lze použít k předpovědi nebo odhadu například dostupnosti chemické látky pro odbourávání (22, 23), transformaci a příjem organismy (24), vymývání půdním profilem (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), vytěkávání z půdy (21, 29, 30) a odtékání z půdního povrchu do vod (18, 31, 32). Údaje o adsorpci lze použít pro účely porovnání a modelování (19, 33, 34, 35).

Distribuce chemické látky mezi půdu a vodnou fázi je složitý proces, který závisí na řadě různých faktorů: na chemické povaze látky (12, 36, 37, 38, 39, 40), na charakteristikách půdy (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) a na klimatických faktorech, jako jsou dešťové srážky, teplota, sluneční svit a vítr. Četné jevy a mechanismy při adsorpci chemické látky v půdě tedy nelze v celém rozsahu definovat zjednodušeným laboratorním modelem, jakým je tato metoda. Přestože nelze tímto pokusem zahrnout všechny možné případy z životního prostředí, poskytuje hodnotné informace o významnosti adsorpce chemické látky z hlediska životního prostředí.

Viz také Obecný úvod.

1.2. ROZSAH

Tato metoda je zaměřena na odhad adsorpčního/desorpčního chování látky v půdách. Cílem je získat sorpční hodnoty, které lze použít pro předpověď distribuce za mnoha podmínek v životním prostředí; k tomuto účelu se pro chemickou látku stanovují rovnovážné adsorpční koeficienty v různých půdách jako funkce půdních charakteristik (např. obsahu organického uhlíku, obsahu jílu, půdní struktury a pH). Pro co nejširší podchycení interakcí dané látky s půdami vyskytujícími se v přírodě musí být použity různé druhy půd.

Při této metodě vyjadřuje adsorpce proces vázání chemické látky na půdní povrch; nerozlišuje se mezi různými adsorpčními procesy (fyzikální a chemickou adsorpcí) a procesy, jako jsou povrchově katalyzované odbourávání, adsorpce hmotou nebo chemická reakce. Adsorpce na koloidních částicích (průměr < 0,2 μm) vznikajících v půdě se nebere v úvahu.

▼B

Půdními parametry, které jsou považovány za nejdůležitější, jsou: obsah organického uhlíku (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), obsah jílu a půdní struktura (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) a pro ionizovatelné sloučeniny také pH (3, 4, 42). Dalšími půdními parametry, které mohou mít vliv na adsorpci/desorpci určité látky jsou efektivní kationtová výměnná kapacita (ECEC), obsah amorfních oxidů železa a hliníku, zejména u vulkanických a tropických půd (4) a rovněž specifický povrch (49).

Zkouška je navržena pro vyhodnocení adsorpce chemické látky na různých druzích půd s proměnlivým obsahem organického uhlíku, jílu, proměnlivou půdní strukturou a proměnlivým pH. Je trojstupňová:

Stupeň 1:. Předběžná studie pro stanovení:

— poměru půda/roztok,

— rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze,

— adsorpce zkoušené látky na povrchu zkušební nádobky a stálosti zkoušené látky po dobu zkoušky.

Stupeň 2:. Screeningová zkouška: adsorpce je studována v pěti různých typech půd měřením adsorpční kinetiky při jedné koncentraci zkoušené látky a stanovením distribučních koeficientů K_d a K_{ou}.

Stupeň 3: Stanovení Freundlichových adsorpčních isotherm za účelem zjištění vlivu koncentrace na rozsah adsorpce v půdách.

Studie desorpce měřením desorpční kinetiky/Freundlichových desorpčních isotherm (dodatek 1).

1.3. DEFINICE A JEDNOTKY

Symbol	Definice	Jednotky
A_{t_i}	procento adsorpce v čase t_i	%
A_{eq}	procento adsorpce při adsorpční rovnováze	%
$m_p^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i	µg
$m_p^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v časovém intervalu Δt_i	µg
$m_p^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	µg
m_0	hmotnost zkoušené látky ve zkušební nádobce na začátku adsorpční zkoušky	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky naměřené v podílu (v_a^A)	µg
$m_{vod}^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze	µg
$m_{půda}$	množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy	g

▼B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{zás}$	hmotnostní koncentrace zásobního roztoku látky	$\mu g/cm^3$
C_0	počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou	$\mu g/cm^3$
$C_{vod}^{ads}(t_i)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i, kdy je prováděna analýza	$\mu g/cm^3$
$C_p^{ads}(eq)$	množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	µg/g
$C_{vod}^{ads}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze	$\mu g/cm^3$
V_0	počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou během adsorpční zkoušky	cm^3
$v_a{}^A$	objem podílu, ve kterém je látka stanovovánad	cm^3
K_d	distribuční koeficient pro adsorpci	cm^3/g
K_{ou}	adsorpční koeficient normalizovaný na organický uhlík	cm^3/g
K_{om}	distribuční koeficient normalizovaný na obsah organických látek	cm^3/g
K_F^{ads}	Freundlichův adsorpční koeficient	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{\ 1/n}\ g^{-1}$
1/n	Freundlichův exponent	
D_{t_i}	procento desorpce v čase t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procento desorpce v časovém intervalu Δt_i	%
K_{des}	zdánlivý desorpční koeficient	cm^3/g
K_F^{des}	Freundlichův desorpční koeficient	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{\ 1/n}\ g^{-1}$
$m_{vod}^{des}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i	µg
$m_p^{des}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	µg
$m_{vod}^{des}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	µg
$m_p^{des}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu	µg
m_{vod}^{A}	hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze	µg
$C_p^{des}(eq)$	množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované v půdě při desorpční rovnováze	µg/g

▼B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{vod}^{des}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	$\mu g/cm^3$
V_T	celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou při měření desorpční kinetiky sériovou metodou	cm^3
V_R	objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	objem podílu odebraného k analýze od okamžiku t_i při měření desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou	cm^3
V_r^i	objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky (i) ke stanovení zkoušené látky při měření desorpční kinetiky (paralelní metoda)	cm^3
V_r^F	objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky ke stanovení zkoušené látky při desorpční rovnováze	cm^3
MB	hmotnostní bilance	%
m_E	celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádobky ve dvou stupních	µg
V_{rec}	objem supernatantu získaný po dosažení adsorpční rovnováhy	cm^3
P_{ov}	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
pK_a	disociační konstanta	
S_v	rozpustnost ve vodě	g/l

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Známé objemy roztoků zkoušené látky isotopově značené nebo neznačené, o známé koncentraci, se v 0,01 M $CaCl_2$ přidají k půdním vzorkům o známé suché hmotnosti, které byly předem uvedeny do rovnováhy s 0,01 M $CaCl_2$. Směs se přiměřenou dobu míchá. Půdní suspense se poté oddělí centrifugací a popřípadě zfiltruje a vodná se fáze se analyzuje. Množství zkoušené látky adsorbované v půdním vzorku se vypočte z rozdílu mezi počátečním množstvím zkoušené látky v roztoku a množstvím, které v něm zbylo na konci experimentu (nepřímá metoda).

Alternativně lze adsorbované množství zkoušené látky stanovit také přímo analýzou půdy (přímá metoda). Tato metoda, která zahrnuje postupnou extrakci vhodným rozpouštědlem, se doporučuje v případech, kdy nelze přesně stanovit rozdíl koncentrací látky v roztocích. Jde například o tyto případy: adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušebních nádobek, nestálost zkoušené látky vzhledem k délce experimentu, nízká adsorpce s malou změnou koncentrace v roztoku a vysoká adsorpce, jejímž důsledkem je nízká koncentrace, kterou nelze přesně stanovit. Použije-li se látka isotopově značená, lze se extrakci půdy vyhnout analýzou půdní fáze spálením a počítáním scintilací v roztoku. To je však nespecifická technika, která nerozlišuje mezi výchozími a transformačními produkty; měla by tedy být použita pouze tehdy, je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá.

▼B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Chemická činidla musí mít analytickou čistotu. Doporučuje se použití radioisotopově neznačených zkoušených látek se známým složením a alespoň 95 % čistotou, nebo značených zkoušených látek, které mají známé složení a jsou isotopově čisté. U značených atomů s krátkým poločasem musí být provedena korekce na rozpad.

Před prováděním zkoušek adsorpcedesorpce by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

a) rozpustnost ve vodě (A.6);

b) tlak par (A.4) a/nebo Henryho konstanta;

c) abiotický rozklad: hydrolýza jako funkce pH (C.7);

d) rozdělovací koeficient (A.8);

e) snadná biologická rozložitelnost (C.4) nebo aerobní a anaerobní transformace v půdě;

f) pKa ionizovatelných látek;

g) přímá fotolýza ve vodě (tj. UV-Vis absorpční spektrum ve vodě, kvantový výtěžek) a fotodegradace v půdě.

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Zkouška je použitelná u látek, pro něž existuje analytická metoda s dostatečnou správností. Důležitým parametrem, který může ovlivnit spolehlivost výsledku, zejména při nepřímé metodě, je stálost zkoušené látky po celou dobu zkoušky. Je tedy předpokladem ověřit stálost v předběžné studii; je-li v průběhu zkoušky pozorována přeměna látky, doporučuje se, aby byla v hlavní studii analyzována jak půdní, tak vodná fáze.

Obtíže mohou nastat při provádění této zkoušky u látek s nízkou rozpustností ve vodě ($S_v < 10^{-4}$ g/l) a rovněž u látek s vyšším nábojem v důsledku toho, že koncentraci ve vodné fázi nelze změřit s dostatečnou správností. V těchto případech musí být podniknuty další kroky. Pokyny pro řešení těchto problémů jsou uvedeny v příslušných částech této metody.

Při zkoušení těkavých látek je třeba dbát na to, aby se v průběhu studie předešlo ztrátám.

1.7. POPIS METODY

1.7.1. **Přístroje a pomůcky, chemická činidla**

Standardní laboratorní vybavení, zejména:

a) Zkumavky nebo nádobky pro provedení experimentů. Je důležité, aby tyto zkumavky nebo nádobky:

— odpovídaly odstředivce, aby se minimalizovaly nepřesnosti v důsledku manipulace a přenášení,

— byly z inertního materiálu, který minimalizuje adsorpci zkoušené látky na jejich stěnách.

▼B

b) Třepací zařízení: třepačka s rotačním pohybem nebo rovnocenné zařízení; třepačka musí v průběhu třepání udržovat půdu v suspensi;

c) Odstředivka: přednostně vysokootáčková, např. s odstředivým zrychlením > 3 000 g, s řízenou teplotou, schopná odstředit z vodného roztoku částice o průměru větším než 0,2 μm. Kyvety by měly být během třepání a centrifugace opatřeny víčky, aby nedošlo ke ztrátám těkavých látek a vody; aby se minimalizovala adsorpce na víčkách, použijí se deaktivovaná víčka, např. šroubová víčka potažená teflonem.

d) Volitelné: filtrační zařízení; filtry s průměrem pórů 0,2 μm, sterilní, na jedno použití. Zvláštní péče by měla být věnována volbě materiálu filtru, aby se předešlo ztrátám zkoušené látky; u špatně rozpustných zkoušených látek se organický materiál filtru nedoporučuje.

e) Analytické přístroje vhodné pro měření koncentrace zkoušené látky.

f) Laboratorní sušárna umožňující udržovat teplotu od 103 °C do 110 °C.

1.7.2. **Charakterizace a výběr půd**

Půdy by měly být charakterizovány třemi parametry, které jsou hlavně odpovědné za adsorpční kapacitu: obsahem organického uhlíku, obsahem jílu a půdní strukturou a hodnotou pH. Jak již bylo uvedeno, (viz oddíl Rozsah), mohou mít další fyzikálně-chemické charakteristiky půdy vliv na adsorpci/desorpci určité látky a měly by být v takových případech zohledněny.

Metody použité pro charakterizaci půdy jsou velmi důležité a mohou významně ovlivnit výsledky. Doporučuje se tedy, aby pH bylo odpovídající metodou ISO (ISO-10390-1) měřeno v 0,01 M $CaCl_2$ (jde o roztok použitý při zkoušení adsorpce/desorpce). Doporučuje se rovněž, aby byly ostatní důležité půdní charakteristiky stanoveny standardními metodami (např. ISO „Handbook of Soil Analysis“); to umožní, aby byla analýza sorpčních údajů založena na světově standardizovaných půdních parametrech. Informace o existujících standardních metodách analýzy a charakterizace půdy jsou uvedeny v literatuře (50–52). Ke kalibraci metod zkoušení půd se doporučují referenční půdy.

Návod pro výběr půd pro adsorpční/desorpční experimenty je uveden v tabulce 1. Sedm vybraných druhů půd pokrývá půdní druhy vyskytující se v mírném zeměpisném pásu. V případě ionizovatelných zkoušených látek by měly vybrané půdy pokrývat široký rozsah pH, aby bylo možné hodnotit adsorpci látky v její ionizované a neionizované formě. Návod k volbě počtu různých půd, které mají být použity v jednotlivých stadiích zkoušky, je uveden v bodu 1.9 Provedení zkoušky.

Upřednostňují-li se jiné druhy půd, měly by být charakterizovány stejnými parametry a měly by mít podobný rozsah vlastností jako v tabulce 1, třebaže kritériím neodpovídají přesně.

▼B

Tabulka 1

Návod pro výběr půdních vzorků pro adsorpci/desorpci

Druh půdy	Rozsah pH (v 0,01 M $CaCl_2$)	Obsah organického uhlíku (%)	Obsah jílu (%)	Struktura půdy (1)
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	jílovitá
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	jílovitohlinitá
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	prachovitohlinitá
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	hlinitá
5	< 4,0–6,0 (2)	< 0,5–1,5 (2) (3)	< 10–15 (2)	hlinitopísčitá
6	> 7,0	< 0,5–1,0 (2) (3)	40–65	jílovitohlinitá/jíl
7	< 4,5	> 10	< 10	písek/hlinitopísčitá

(1) Podle FAO a amerického systému (85).
(2) Příslušné hodnoty parametrů by měly přednostně ležet v uvedeném rozmezí. Vyskytnouli se však při hledání vhodného půdního materiálu obtíže, jsou přijatelné i hodnoty ležící pod uvedeným minimem.
(3) U půd s obsahem organického uhlíku nižším než 0,3 % může být porušena korelace mezi obsahem organických látek a adsorpcí. Doporučuje se tedy používat půdy s minimálním obsahem organického uhlíku 0,3 %.

1.7.3. **Sběr a uchovávání půdních vzorků**

1.7.3.1. *Sběr*

Není doporučena žádná specifická technika odběru vzorků; technika odběru závisí na účelu studie (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Je třeba zvážit tyto hlediska:

a) informace o historii lokality jsou nezbytné; zahrnují informace o lokalitě, vegetaci, použití pesticidů nebo hnojiv, o biologických nánosech nebo náhodné kontaminaci. Pokud jde o popis místa odběru, měla by být dodržena doporučení normy ISO o vzorkování půd (ISO 10381-6);

b) místo odběru musí být definováno souřadnicemi UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) nebo zeměpisnými souřadnicemi; to by mohlo umožnit opakovaný odběr dané půdy v budoucnu nebo pomoci při určení půdy podle různých klasifikačních systémů používaných v různých zemích. Kromě toho by měl být vzorkován pouze horizont A do maximální hloubky 20 cm. Zvláště je-li u půdního druhu č. 7 součástí půdy horizont O_h, měl by být zahrnut do vzorkování.

Půdní vzorky by měly být přepravovány v kontejnerech a za teploty, jež zaručí, že nedojde k výrazné změně původních charakteristik půdy.

▼B

1.7.3.2. *Uchovávání*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebraných půd. Pouze není-li to možné, mohou být půdy uchovávány při teplotě okolí a suszeny na vzduchu. Pro dobu uchovávání neexistuje žádný doporučený limit, ale půdy uchovávané déle než tři roky by měly být před použitím znovu analyzovány na obsah organického uhlíku, pH a CEC (kationtovou výměnnou kapacitu).

1.7.3.3. *Zpracování půdních vzorků a jejich příprava ke zkoušce*

Půdy se vysuší na vzduchu při teplotě okolí (přednostně při 20–25 °C). Rozrušení půd se provede minimální silou, aby se původní struktura půdy změnila co nejméně. Půdy se prosejí na sítu, aby se získaly částice o velikosti ≤ 2 mm; při prosévání by měla být dodržována doporučení normy ISO o vzorkování půdy (ISO 10381-6). Doporučuje se opatrná homogenizace, neboť tím se zvyšuje reprodukovatelnost výsledků. Vlhkost každé půdy se stanoví v třech alikvotech zahříváním při 105 °C, dokud se významně mění hmotnost (přibližně 12 hodin). Ve všech výpočtech se hmotností půdy rozumí hmotnost po sušení v sušárně, tj. hmotnost půdy korigovaná na obsah vlhkosti.

1.7.4. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se rozpustí v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě; roztok $CaCl_2$ se použije jako vodná rozpouštědlová fáze, aby se zlepšila centrifugace a minimalizovala kationtová výměna. Koncentrace zásobního roztoku by měla být přednostně o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti použité analytické metody. Tento práh zabezpečuje přesnost měření s ohledem na metodiku použitou při tomto postupu; kromě toho by měla být koncentrace zásobního roztoku nižší než rozpustnost zkoušené látky ve vodě.

Zásobní roztok by se měl připravovat nejlépe těsně před aplikací na půdní vzorky a uchovávat uzavřený v temnu při 4 °C. Doba uchovávání závisí na stálosti zkoušené látky a na její koncentraci v roztoku.

Pouze u špatně rozpustných látek ($S_v < 10^{-4}$ g/l) může být nezbytné použití solubilizačního činidla, je-li obtížné zkoušenou látku rozpustit. Solubilizační činidlo: a) by mělo být mísitelné s vodou, např. methanol nebo acetonitril, b) jeho koncentrace by neměla překročit 1 % celkového objemu zásobního roztoku a jeho podíl by měl být nižší v roztoku zkoušené látky přicházejícím do kontaktu s půdou (přednostně v koncentraci nižší než 0,1 %) a c) nemělo by být povrchově aktivní a nemělo by podléhat solvolytickým reakcím se zkoušenou chemickou látkou. Použití solubilizačního činidla by mělo být uvedeno a odůvodněno při uvádění údajů.

Jinou možností u špatně rozpustných látek je jejich vmíchání do systému: zkoušená látka se rozpustí v organickém rozpouštědle a alikvot se přidá ke směsi půdy a 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě. Obsah organického rozpouštědla ve vodné fázi by měl být co nejnižší a obvykle by neměl překročit 0,1 %. Nedostatkem vmíchání v organickém rozpouštědle je nereprodukovatelnost objemu. To může znamenat vnesení další chyby, neboť koncentrace zkoušené látky a kosolventu nebývají ve všech zkouškách stejné.

▼B

1.8. PŘEDPOKLADY PRO PROVEDENÍ ADSORPČNÍ/DESORPČNÍ ZKOUŠKY

1.8.1. **Analytická metoda**

Klíčovými parametry, které mohou mít vliv na správnost měření sorpce, jsou správnost metody analýzy jak roztoku, tak adsorbované fáze, stálost a čistota zkoušené látky, dosažení sorpční rovnováhy, velikost změny koncentrace roztoku, poměr půda/roztok a změny v půdní struktuře během ustavování rovnováhy (35, 59–62). Některé příklady týkající se problematiky správnosti jsou uvedeny v dodatku 2.

Spolehlivost použité analytické metody musí být ověřována v rozmezí koncentrací, které se mohou vyskytnout v průběhu zkoušky. Je na experimentátorovi, aby vyvinul vhodnou metodu s náležitou správností, přesností, reprodukovatelností, mezí stanovitelnosti a výtěžkem. Návodem k provedení takové zkoušky je níže uvedený experiment.

Vhodný objem 0,01 M $CaCl_2$, např. 100 cm^3, se protřepává 4 hodiny např. s 20 g půdy o vysoké adsorpční schopnosti, tj. s vysokým obsahem organického uhlíku a jílu; tato hmotnost a objem se mohou měnit podle požadavků analýzy, avšak poměr půda/roztok 1:5 je vhodnou výchozí hodnotou. Směs se odstředí a vodná fáze se může zfiltrovat. K vodné fázi se přidá určitý objem zásobního roztoku zkoušené látky, aby bylo dosaženo nominální hodnoty v koncentračním rozsahu, který se může vyskytnou v průběhu zkoušky. Tento objem by neměl překročit 10 % konečného objemu vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně. Roztok se analyzuje.

Založí se jeden slepý pokus s půdou a roztokem $CaCl_2$ (bez zkoušené látky) a podrobí se kontrole, pokud jde o nahodilé chyby analytické metody a vlivy matrice způsobené půdou.

Mezi analytické metody, které mohou být použity k sorpčním měřením, patří plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází, (GLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), spektrometrie (např. GC/hmotová spektrometrie, HPLC/hmotová spektrometrie) a počítání scintilací v roztoku (pro isotopově značené látky). Bez ohledu na použitou analytickou metodu se za přiměřené považují výtěžky od 90 % do 110 % nominální hodnoty. Má-li se provést detekce a vyhodnocení poté, co došlo k rozdělení, musí být meze stanovitelnosti analytické metody alespoň o dva řády nižší než nominální koncentrace.

Charakteristiky a meze stanovitelnosti analytické metody použitelné pro provedení studií adsorpce hrají významnou roli při určení zkušebních podmínek a při celém experimentálním provedení zkoušky. Tato metoda sleduje obecný experimentální postup a obsahuje doporučení a pokyny pro alternativní řešení, pokud analytická metoda a laboratorní vybavení přinášejí omezení.

▼B

1.8.2. **Výběr optimálních poměrů půda/roztok**

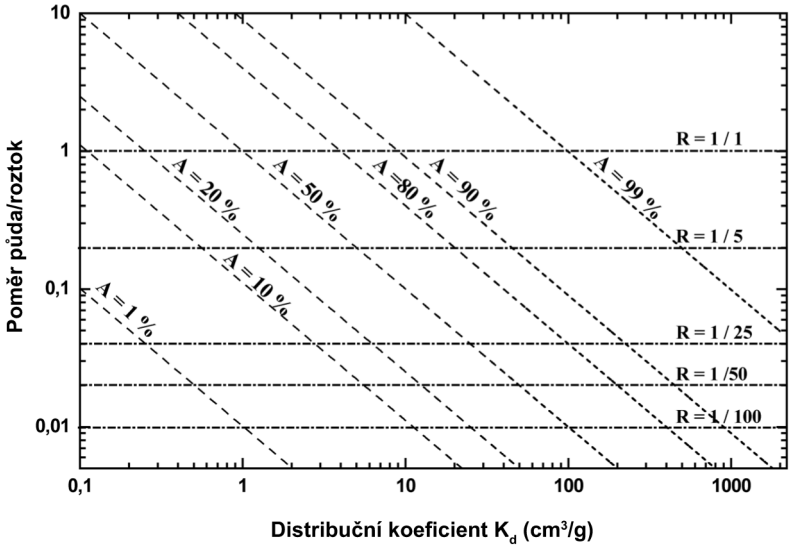
Výběr vhodných poměrů půda/roztok pro sorpční studie závisí na distribučním koeficientu K_d a na požadovaném relativním stupni adsorpce. Změna koncentrace látky v roztoku je určující pro statistickou správnost měření v důsledku formy adsorpční rovnice a omezení analytické metodiky při stanovování koncentrace chemické látky v roztoku. V obecné praxi je tedy užitečné určit několik fixních poměrů, pro něž je adsorbovaný podíl vyšší než 20 %, a přednostně > 50 % (62), a dbát na to, aby byla koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi dostatečně vysoká pro její přesné změření. To je zvláště důležité u vysokých adsorbovaných podílů.

Vyhovující přístup k výběru vhodných poměrů půda/voda je založen na odhadu hodnoty K_d buď předběžnými studiemi, nebo zavedenými metodami odhadu (dodatek 3). Vhodný poměr lze poté vybrat na základě grafického znázornění závislosti poměru půda/roztok na K_d pro pevné hodnoty adsorpce (obrázek 1). V tomto grafickém vyjádření se předpokládá, že je adsorpční rovnice lineární ([1]). Použitelný poměr se získá upravením rovnice pro K_d (4) do tvaru rovnice (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{půda}}} = \left(\frac{m_0}{m_p^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

nebo do její logaritmické formy za předpokladu, že $R = m_{\text{půda}}/V_0$ a $A_{eq}\ \%/100 = \dfrac{m_p^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



Obrázek 1 Vztah mezi poměry půda/roztok a hodnotou K_d při různých podílech adsorbované zkoušené látky

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Na obrázku 1 jsou uvedeny požadované poměry půda/roztok jako funkce K_d pro různé úrovně adsorpce. Například při poměru půda/roztok 1:5 a při K_d 20 by došlo přibližně k 80 % adsorpci. Má-li dojít při téže hodnotě K_d k 50 % adsorpci, musí být použit poměr 1:25. Tento přístup k výběru vhodných poměrů půda/roztok umožňuje pružně vyhovět experimentálním potřebám.

Obtížněji se řeší oblasti, kde se chemická látka adsorbuje silně nebo velmi slabě. Je-li adsorpce nízká, doporučuje se poměr půda/roztok 1:1, třebaže u některých vysloveně organických druhů půdy může být k získání suspense nezbytný nižší poměr. Musí být přitom věnována péče analytické metodice měření malých změn koncentrace roztoku, jinak bude adsorpční měření nepřesné. Na druhé straně se může při velmi vysokých distribučních koeficientech $K_d$dospět až k poměru půda/roztok 1:100, má-li v roztoku zůstat významné množství chemické látky. Je však třeba dbát na dobré promíchání a musí být ponechána dostatečná doba k tomu, aby systém dosáhl rovnováhy. Jiným přístupem k řešení těchto extrémních případů, kdy chybí vhodná anylytická metodika, je předpověď hodnoty K_d za použití techniky odhadu založené například na hodnotách P_{ov} (dodatek 3). Může být užitečný zvláště u slabě adsorbovaných nebo polárních chemických látek s $P_{ov} < 20$ a u lipofilních/silně adsorbovaných chemických látek $P_{ov} > 10^4$.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

Všechny experimenty se provádějí při teplotě okolí a pokud možno při konstantní teplotě od 20 °C do 25 °C.

Podmínky odstřeďování by měly umožnit odstranit z roztoku částice větší než 0,2 μm. Tato velikost patří nejmenším částicím považovaným za pevné částice a je hranicí mezi pevnými a koloidními částicemi. Návod ke stanovení podmínek odstřeďování je uveden v dodatku 4.

Nezaručuje-li odstředivka, že částice větší než 0,2 μm, budou odstraněny, může být použita kombinace odstřeďování a filtrace přes 0,2 μm filtry. Tyto filtry musí být z vhodného inertního materiálu, aby na nich nedošlo k žádným ztrátám zkoušené látky. V každém případě by mělo být ověřeno, že při filtraci nedochází k žádným ztrátám zkoušené látky.

1.9.2. **Stupeň 1 – předběžná studie**

Účel provedení předběžné studie byl již uveden v oddíle Rozsah. Návodem pro provedení takové studie je dále navržený experiment.

1.9.2.1. *Výběr optimálních poměrů půda/roztok*

Použijí se dva půdní druhy a tři poměry půda/roztok (šest experimentů). Jeden půdní druh s vysokým obsahem organického uhlíku a nízkým obsahem jílu a druhý půdní druh s nízkým obsahem organického uhlíku a vysokým obsahem jílu. Jsou navrženy tyto poměry půda/roztok:

— 50 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/1),

▼B

— 10 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/5),

— 2 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/25).

Minimální množství půdy, se kterým lze experiment provést, závisí na laboratorním vybavení a na účinnostních charakteristikách použitých analytických metod. Doporučuje se však použít alespoň 1 g, a přednostně 2 g, aby zkouška poskytla spolehlivé výsledky.

Jeden kontrolní vzorek obsahující pouze zkoušenou látku v 0,01 M $CaCl_2$ (bez půdy) se podrobí naprosto stejnému postupu jako zkušební systémy, a to s cílem ověřit stálost zkoušené látky v roztoku $CaCl_2$ a její eventuální adsorpci na povrchu zkušebních nádob.

Se stejným množstvím půdy a celkem 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ (bez zkoušené látky) se provede slepý pokus stejným postupem. Účelem je kontrola hodnot pozadí během analýzy s cílem najít rušící látky nebo rozeznat kontaminované půdy.

Všechny experimenty včetně kontrolních a slepých pokusů se provedou alespoň dvojmo. Celkový počet vzorků, které by měly být pro studii připraveny, lze vypočítat s ohledem na metodiku, podle které bude postupováno.

Metody pro předběžnou studii a hlavní studii jsou obecně stejné, případné výjimky jsou uvedeny.

Vzorky vysušené na vzduchu se den před experimentem uvedou přes noc (12 hodin) do rovnováhy protřepáváním s 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Poté se určitým objemem zásobního roztoku zkoušené látky upraví konečný objem na 50 cm^3. Tento objem přidaného zásobního roztoku: a) by neměl být vyšší než 10 % konečného objemu 50 cm^3 vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně; a b) měl by vést k počáteční koncentraci zkoušené látky v kontaktu s půdou (C_0) alespoň o dva řády vyšší než je mez stanovitelnosti analytické metody; tento práh zabezpečuje možnost provést přesné měření i při vysoké adsorpci (> 90 %) a později stanovit adsorpční izotermy. Doporučuje se rovněž, aby počáteční koncentrace látky (C_0) pokud možno nepřekračovala polovinu hodnoty rozpustnosti látky.

Příklad výpočtu koncentrace zásobního roztoku látky ($C_{zás}$) je uveden níže. Předpokládá se mez stanovitelnosti 0,01 μg/cm^3 a 90 % adsorpce; počáteční koncentrace zkoušené látky v kontaktu s půdou by tedy měla být přednostně 1 μg/cm^3 (o dva řády vyšší, než je mez stanovitelnosti). Za předpokladu, že bude přidán maximální doporučený objem zásobního roztoku, tj. 5 k 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ pro ustavení rovnováhy, (tj. 10 % přídavek zásobního roztoku v celkovém objemu vodné fáze 50 cm^3) by měla být koncentrace zásobního roztoku 10 μg/cm; tj. o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody.

pH vodné fáze se měří před kontaktem s půdou a po něm, neboť hraje významnou roli v celém adsorpčním procesu, zvláště u ionizovatelných látek.

▼B

Směs se protřepává, dokud se neustaví adsorpční rovnováha. Doba nezbytná k dosažení rovnováhy v půdě silně kolísá v závislosti na chemické látce a půdě; zpravidla stačí 24 hodin (77). V předběžné studii lze vzorky odebírat postupně v průběhu 48hodinového míchání (například 4, 8, 24, 48 hodin). Čas analýzy by však měl být volen pružně s ohledem na pracovní plán laboratoře.

Existují dvě možnosti analýzy zkoušené látky ve vodném roztoku: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Je třeba zdůraznit, že ačkoli je paralelní metoda experimentálně pracnější, je matematické zpracování jejích výsledků jednodušší (dodatek 5). Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se však ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit dostupné laboratorní vybavení a zdroji.

a) Paralelní metoda: připraví se tolik vzorků s se stejným poměrem půda/roztok, kolik je časových intervalů, v nichž se má provést studium adsorpční kinetiky. Po centrifugaci a popřípadě po filtraci se z první zkušební nádobky odebere pokud možno úplně vodná fáze a měří se např. po 4 hodinách; vodná fáze druhé zkušební nádobky se změří po 8 hodinách, vodná z fáze třetí zkušební nádobky po 24 hodinách atd.

b) Sériová metoda: pro každý poměr půda/roztok se připraví pouze dva vzorky. V definovaných časových intervalech se směs zcentrifuguje a fáze se oddělí. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Následuje-li po centrifugaci filtrace, měla by mít laboratoř zařízení pro filtraci malých podílů vodné fáze. Doporučuje se, aby celkový objem odebraného podílu nepřesahoval 1 % celkového objemu roztoku, aby se významně nezměnil poměr půda/roztok a aby se během zkoušky nesnížilo množství rozpuštěné látky, které je k dispozici pro adsorpci.

Procento adsorpce A_{t_i} se pro každý čas (t_i) vypočte z nominální počáteční koncentrace a naměřené koncentrace v čase odebrání vzorku (t_i), po korekci na hodnoty slepého pokusu. Sestrojí se závislosti A_{t_i} na čase (obrázek 1 v dodatku 5), aby se určilo dosažení rovnovážného plató ([1]). Rovněž se vypočte hodnota K_d při rovnováze. Na základě této hodnoty K_d se z obrázku 1 vyberou vhodné poměry půda/roztok tak, aby adsorpce dosahovala více než 20 % a přednostně více než 50 % (61). Všechny použitelné rovnice a zásady pro sestrojování závislostí jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

1.9.2.2. *Stanovení rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze*

Jak již bylo uvedeno, závislosti A_{t_i} nebo C_{aq}^{ads} na čase umožňují odhadnout určit dosažení adsorpční rovnováhy a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze. Příklady těchto závislostí jsou na obrázcích 1 a 2 v dodatku 5. Rovnovážná doba je doba nezbytná k tomu, aby bylo v systému dosaženo plató.

([1]) Závislosti koncentrace zkušební látky ve vodné fázi C_{aq}^{ads} na čase by mohly být rovněž použity k určení dosažení rovnovážného plató (viz obrázek 2 v dodatku 5).

▼B

Nevyskytuje-li se u určité půdy plató, nýbrž je pozorován stálý nárůst, může to být způsobeno komplikujícími faktory, jako jsou biologický rozklad a pomalá difuse. Biologický rozklad lze prokázat opakováním experimentu se sterilizovaným vzorkem půdy. Není-li ani v tomto případě dosaženo plató, měl by experimentátor pátrat po jiných jevech, ke kterým by mohlo při studiích docházet; může tak učinit vhodnou změnou experimentálních podmínek (teploty, doby protřepávání, poměrů půda/roztok). Ponechává se na rozhodnutí experimentátora, zda bude pokračovat ve zkušebním postupu i přesto, že rovnováhy případně nebude dosaženo.

1.9.2.3. *Adsorpce na stěnách zkušební nádobky a stálost zkoušené látky*

Některé informace o adsorpci zkoušené látky na povrchu zkušební nádobky a rovněž o stálosti zkoušené látky lze odvodit z analýzy kontrolních vzorků. Pozoruje-li se úbytek větší, než odpovídá obvyklé chybě analytické metody, může docházet k abiotickému rozkladu a/nebo adsorpci na povrchu zkušební nádobky. Tyto dva jevy lze rozlišit důkladným omytím stěn nádobky známým objemem vhodného rozpouštědla a analýzou výplachu na zkoušenou látku. Není-li zjištěna adsorpce na povrchu zkušební nádobky, ukazuje úbytek na abiotickou nestálost zkoušené látky. Je-li zjištěna adsorpce, je nezbytné změnit materiál zkušebních nádobek. Údaje o adsorpci na povrchu zkušebních nádobek získaná v tomto experimentu však nelze přímo extrapolovat na experimenty půdou a roztoky. Přítomnost půdy bude mít na tuto adsorpci vliv.

Další informace o stálosti zkoušené látky lze odvodit z hmotnostní bilance výchozí látky provedené v průběhu času. To znamená, že se na zkoušenou látku analyzují vodná fáze, extrakty půdy a stěny zkušební nádobky. Rozdíl mezi hmotností přidané zkoušené látky a součtem hmotností zkoušené látky ve vodné fázi, v extraktech půdy a na povrchu zkušební nádobky je roven hmotnosti, které se rozložila, vytěkala nebo se neextrahovala. Má-li být provedena hmotnostní bilance, mělo by být v době experimentu dosaženo adsorpční rovnováhy.

Hmotnostní bilance se provede u obou druhů půd a pro jeden poměr půda/roztok u každé půdy, u něhož je úbytek při rovnováze větší než 20 % a nejlépe větší něž 50 %. Je-li experiment ukončen analýzou posledního vzorku po 48 hodinách, fáze se oddělí centrifugací a popřípadně i filtrací. Oddělí se pokud možno veškerá vodná fáze a k půdě se přidá vhodné extrakční rozpouštědlo (extrakční koeficient alespoň 95 %) pro extrakci zkoušené látky. Doporučují se alespoň dvě extrakce za sebou. Stanoví se množství zkoušené látky v půdě a v extraktech ze zkušební nádobky a vypočítá se hmotnostní bilance (rovnice 10, Údaje a jejich předkládání). Je-li nižší než 90 %, považuje se zkoušená látka za nestálou v časovém měřítku zkoušky. Studie však může pokračovat, zohlední-li se nestálost zkoušené látky; v takovém případě se doporučuje, aby byly v hlavní studii analyzovány obě fáze.

▼B

1.9.2.4. *Stupeň 2 – adsorpční kinetika při jedné koncentraci zkoušené látky*

Použije se pět druhů půd vybraných z tabulky 1. Je výhodné zahrnout přitom některé nebo všechny půdy z předběžné studie. V tomto případě nemusí být stupeň 2 opakován pro půdy použité v předběžné studii.

Rovnovážná doba, poměr půda/roztok, hmotnost půdního vzorku, objem vodné fáze v kontaktu s půdou a koncentrace zkoušené látky v roztoku se volí na základě výsledků předběžné studie. Analýzy se provádějí přednostně po 2, 4, 6, 8 (eventuálně také po 10) a 24 hodinách kontaktu s půdou; protřepávání může být prodlouženo maximálně na 48 hodin u chemických látek, u nichž je pro dosažení rovnováhy podle výsledků předběžných studií nezbytný delší čas. Doby lze však volit pružně.

Každý experiment (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede alespoň dvakrát, aby bylo možné odhadnout rozptyl výsledků. S každým experimentem se provede jeden slepý pokus. Provede se s půdou a s 0,01 M roztokem $CaCl_2$ bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez půdy), který slouží jako pojistka proti nečekaným výsledkům.

Procento absorpce se vypočte pro každý čas A_{t_i} a pro každý interval $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeby) a vynese se proti času. Rovněž se vypočtou distribuční koeficient K_d při rovnováze a adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku K_{ou} (pro nepolární organické chemické látky).

Výsledky zkoušky adsorpční kinetiky

Lineární model K_d vyjadřující vlastní pohyblivost chemických látek v půdě je obecně dostatečně přesný (35, 78). Například chemické látky s $K_d \leq 1$ cm^3/g jsou obecně považovány za kvalitativně mobilní. Podobně bylo MacCallem et al. (16) vyvinuto klasifikační schéma mobility založené na hodnotách K_{ou}. Kromě toho existují klasifikační schémata vymývatelnosti založená na vztahu mezi K_{ou} a DT-50 ([1]) (32, 79).

Podle analýzy chyb (61) nelze z poklesu koncentrace ve vodné fázi přesně určit hodnoty K_d nižší než 0,3 cm^3/g, a to ani při nejpříznivějším (z hlediska správnosti) poměru půda/roztok, tj. při poměru 1:1. V takovém případě se doporučuje analýza obou fází – půdy i roztoku.

([1]) DT-50: doba rozkladu 50 % zkoušené látky.

▼B

S ohledem na výše uvedené poznámky se doporučuje pokračovat ve studii adsorpčního chování chemické látky v půdě a její případné mobility stanovením Freundlichových adsorpčních isotherm pro tyto systémy, u nichž je přesné stanovení K_d možné provést způsobem, kterým se postupuje v této zkušební metodě. Přesné stanovení je možné, je-li součin hodnoty K_d a poměru půda/roztok > 0,3 při měření založeném na poklesu koncentrace ve vodné fázi (nepřímá metoda), nebo je-li součin > 0,1 při analýze obou fází (přímá metoda) (61).

1.9.2.5. *Stupeň 3 – adsorpční isothermy a desorpční kinetika/desorpční isothermy*

1.9.2.5.1. Adsorpční isothermy

Použije se pět koncentrací zkoušené látky, přednostně v rozsahu dvou řádů; při volbě koncentrací se zohlední rozpustnost ve vodě a výsledná rovnovážná koncentrace ve vodné fázi. Při studii se u každé půdy použije tentýž poměr půda/roztok. Adsorpční zkouška se provede výše uvedenou metodou pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou po uplynutí doby, která je nezbytná pro dosažení rovnováhy a která byla stanovena dříve ve stupni 2. Stanoví se rovnovážné koncentrace v roztoku a adsorbované množství se vypočte z úbytku zkoušené látky v roztoku nebo přímou metodou. Adsorbovaná hmotnost na jednotku hmotnosti půdy se vynese jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky (viz oddíl Údaje a jejich předkládání)

Výsledky experimentu pro stanovení adsorpčních isotherm

Z dosud navržených matematických modelů adsorpčních isotherm se k popisu adsorpčních procesů používá Freundlichova isotherma nejčastěji. Podrobnější informace o interpretaci a významu adsorpčních modelů jsou uvedeny v literatuře (41, 45, 80, 81, 82).

Poznámka: Je třeba poznamenat, že hodnoty K_F (Freundlichovy adsorpční koeficienty) lze pro různé látky porovnávat pouze tehdy, jsou-li tyto hodnoty vyjádřeny ve stejných jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpční kinetika

Účelem tohoto experimentu je vyšetřit, zda je chemická látka adsorbována v půdě vratně nebo nevratně. Tato informace je důležitá, neboť desorpční proces hraje také důležitou roli v chování chemické látky v půdě. Desorpční údaje jsou kromě toho užitečným vstupem pro počítačové modelování vyluhování a pro simulaci vyplavování rozpuštěných látek. Je-li studie desorpce žádoucí, doporučuje se, aby byla níže popsaná studie provedena na každém systému, na kterém bylo v předchozí studii adsorpční kinetiky možné provést přesné stanovení K_d.

Podobně jako u studie adsorpční kinetiky existují dvě volby, jak postupovat při studium desorpční kinetiky: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit laboratorní vybavení a zdroje, které jsou k dispozici.

▼B

a) Paralelní metoda: pro každou půdu zahrnutou do studie desorpce se připraví tolik vzorků se stejným poměrem půda/roztok, kolik bude časových intervalů, v nichž se má studovat desorpční kinetika. Zvolí se přednostně stejné časové intervaly jako v experimentu při studium adsorpční kinetiky; celkový čas se však může prodloužit podle potřeby, aby bylo v systému dosaženo desorpční rovnováhy. S každým experimentem (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede slepý pokus s půdou a s 0,01 M roztokem $CaCl_2$ bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez půdy). Všechny směsi půdy s roztokem se protřepávají do ustavení adsorpční rovnováhy (jak byla určena dříve ve stupni 2). Poté se fáze oddělí centrifugací a vodná fáze se co nejúplněji odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M $CaCl_2$ bez zkoušené látky a nová směs se opět protřepává. Vodná fáze první zkušební nádobky se co nejúplněji odebere a změří například po 2 hodinách, vodná fáze druhé zkušební nádobky se změří po 4 hodinách, vodná fáze třetí zkušební nádobky se změří po 6 hodinách atd., až do dosažení desorpční rovnováhy.

b) Sériová metoda: po experimentu pro stanovení adsorpční kinetiky se směs zcentrifuguje a vodná fáze se co nejúplněji odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M $CaCl_2$ bez zkoušené látky. Nová směs se protřepává až do ustavení desorpční rovnováhy. Během této doby se ve stanovených časových intervalech směs centrifuguje, aby se oddělily fáze. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Objem každého jednotlivého podílu by měl být menší než 1 % celkového objemu. Ke směsi se přidá stejné množství čerstvého 0,01 M roztoku $CaCl_2$, aby se zachoval poměr půda/roztok, a v protřepávání se pokračuje až do dalšího časového intervalu.

Procento desorpce se vypočte pro každý čas (D_{t_i}) a pro každý interval ($D_{\Delta t_i}$) (podle potřeb studie) a vynese se do grafu proti času. Rovněž se vypočte hodnota desorpčního koeficientu K_{des} při rovnováze. Všechny použité rovnice jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

Výsledky studia desorpční kinetiky

Společný graf závislostí procenta desorpce D_{t_i} a adsorpce A_{t_i} na čase umožní odhadnout vratnost adsorpčního procesu. Je-li desorpční rovnováhy dosaženo v čase menším než dvojnásobek doby potřebné pro dosažení adsorpční rovnováhy a je-li celková desorpce vyšší než 75 % adsorbovaného množství, považuje se adsorpce za vratnou.

1.9.2.5.3. Desorpční isothermy

Freundlichovy desorpční isothermy se určují v půdách použitých ke stanovení adsorpčních isotherm. Zkouška desorpce se provede způsobem popsaným v oddíle Desorpční kinetika, pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou, a to při desorpční rovnováze. Vypočte se množství desorbované zkoušené látky. Množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po dosažení desorpční rovnováhy se vynese do grafu jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky v roztoku (viz oddíl Údaje a jejich předkládání a dodatek 5).

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

Analytické údaje se uvedou ve formě tabulky (viz dodatek 6). Uvedou se jednotlivá měření a vypočtené průměrné hodnoty. Předloží se grafy adsorpčních isotherm. Výpočty se provedou níže uvedeným způsobem.

Pro účely zkoušky se předpokládá, že hmotnost 1 cm^3 vodného roztoku je 1 g. Poměr půda/roztok může být vyjádřen stejným číslem pro rozměr hmotnost/hmotnost i pro rozměr hmotnost/objem.

2.1. ADSORPCE

Adsorpce A_{t_i} je definována jako procentuální podíl látky z množství látky na začátku zkoušky, která se za zkušebních podmínek adsorbovala v půdě. Je-li zkoušená látka stálá a neadsorbuje se významně na stěnách nádobky, vypočte se A_{t_i} pro každý čas z rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

kde:

A_{t_i} = procento adsorpce v čase t_i (%);

$m_p^{ads}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i (μg);

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce A_{t_i} pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Distribuční koeficient K_d je poměr mezi množstvím látky v půdě a hmotnostní koncentrací látky ve vodném roztoku za zkušebních podmínek a při dosažení adsorpční rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_p^{ads}(eq)}{C_{vod}^{ads}(eq)} = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{vod}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}}(cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (4)$$

kde:

$C_p^{ads}(eq)$ = množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg/g),

$C_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze (μg/cm). Tato koncentrace se stanoví analyticky a zohlední se hodnoty ze slepých pokusů,

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{půda}$ = množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy (g),

V_0 = počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou (cm^3).

Vztah mezi A_{eq} a K_d je dán rovnicí:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}}(cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

kde:

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze, %.

Vztah adsorpčního koeficientu normalizovaného na obsah organického uhlíku K_{ou}, distribučního koeficientu K_d a obsahu organického uhlíku v půdním vzorku je tento:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (6)$$

kde:

%ou = procentuální obsah organického uhlíku v půdním vzorku (g/g).

Koeficient K_{ou} je jedinou veličinou, která charakterizuje rozdělení hlavně anorganických nepolárních látek mezi organický uhlík v půdě nebo sediment a vodu. Adsorpce těchto chemických látek koreluje s obsahem organických látek v pevném sorbujícím materiálu (7); hodnoty K_{ou} závisí na specifických charakteristikách huminových podílů, jejichž sorpční kapacita se značně liší podle původu, vzniku atd.

2.1.1. **Adsorpční isothermy**

Rovnice Freundlichových adsorpčních isotherm vyjadřují vztah mezi množstvím adsorbované zkoušené látky a koncentrací zkoušené látky v roztoku při rovnováze (rovnice 8).

Údaje se zpracovávají jako v oddíle Adsorpce a pro každou zkušební nádobku se vypočte množství zkoušené látky adsorbované v půdě po adsorpční zkoušce ($C_p^{ads}(eq)$, jinde označeno jako x/m). Předpokládá se, že rovnováhy bylo dosaženo a že $C_p^{ads}(eq)$ představuje rovnovážnou hodnotu:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{půda}} = \frac{[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{půda}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpční rovnice má tento tvar (8):

$$C_p^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{vod}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (8)$$

nebo v lineární formě:

$$\log C_p^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{ads}(eq) \quad (9)$$

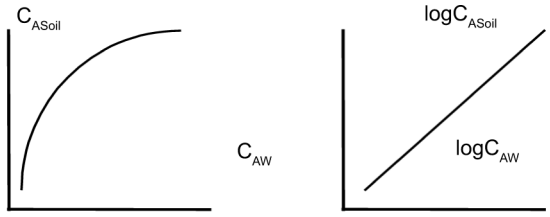
kde:

K_F^{ads} = Freundlichův adsorpční koeficient; jeho rozměr je cm^3/g pouze tehdy, je-li 1/n = 1; ve všech ostatních případech se směrnice 1/n zavádí do rozměru K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}/g$);

n = regresní konstanta; 1/n se zpravidla pohybuje v rozmezí od 0,7 do 1,0, což znamená, že jsou sorpční údaje často nelineární.

Rovnice (8) a (9) se znázorní graficky a hodnoty K_F^{ads} a 1/n se vypočítají regresní analýzou podle rovnice 9. Vypočte se rovněž korelační koeficient r^2 této logaritmické rovnice. Příklady takových znázornění jsou uvedeny na obrázku 2.

▼B



Obrázek 2 Freundlichovy adsorpční závislosti, normální a linearizovaná

2.1.2. **Hmotnostní bilance**

Hmotnostní bilance (MB) je definována jako procentuální podíl látky z nominálního množství látky na začátku zkoušky, který lze znovu analyticky stanovit po adsorpční zkoušce.

Zpracování údajů se bude lišit podle toho, zda je rozpouštědlo neomezeně mísitelné s vodou. U rozpouštědel mísitelných s vodou mohou být údaje ke stanovení množství látky získané extrakcí rozpouštědlem zpracována stejným způsobem jako v oddíle Desorpce. Je-li rozpouštědlo mísitelné s vodou omezeně, musí být stanoveno množství znovu získané látky.

Hmotnostní bilance pro adsorpci se vypočte takto; předpokládá se, že (m_E) se odpovídá součtu množství zkoušených látek extrahovaných organickým rozpouštědlem z půdy a z povrchu zkušební nádobky:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{vod}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kde:

MB = hmotnostní bilance (%),

m_E = celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádobky ve dvou stupních (μg),

C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (μg/cm),

V_{rec} = objem supernatantu vyzískaný po dosažení adsorpční rovnováhy (cm^{-3}).

2.2. DESORPCE

Desorpce (D) je definována jako procentuální podíl z dříve adsorbovaného množství zkoušené látky, který se za zkušebních podmínek desorbuje:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

kde:

D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%),

▼B

$m_{vod}^{des}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i (μg),

$m_{půda}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce D_{t_i} pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Zdánlivý desorpční koeficient (K_{des}) je za zkušebních podmínek poměr mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala v půdě, a hmotnostní koncentrací desorbované látky ve vodném roztoku po dosažení desorpční rovnováhy:

$$K_{des} = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{vod}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{půda}} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = desorpční koeficient (cm^3/g),

$m_{vod}^{des}(eq)$ = celková hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy při desorpční rovnováze (μg),

V_T = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během zkoušky desorpční kinetiky (cm^3).

Návod pro výpočet hodnoty $m_{vod}^{des}(eq)$ je uveden v dodatku 5 v oddíle Desorpce.

Poznámka:

Provede-li se předcházející adsorpční zkouška paralelní metodou, je objem V_T v rovnici 12 roven V_0.

2.2.1. **Desorpční isothermy**

Freundlichovy desorpční isothermy vyjadřují vztah mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě a koncentrací zkoušené látky v roztoku při desorpční rovnováze (rovnice 16).

Pro každou zkušební nádobku se množství zkoušené látky, které zůstalo při desorpční rovnováze adsorbované v půdě, vypočte takto:

$$C_p^{des}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{půda}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{vod}^{des}(eq)$ je definována takto:

$$m_{vod}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{vod}^A (\mu g) \quad (14)$$

kde:

$C_p^{des}(eq)$ = množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě při desorpční rovnováze (μg/g),

$m_m^{des}(eq)$ = analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze (μg),

▼B

m_{vod}^{A} = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg),

$m_{vod}^{des}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

$$m_{vod}^{A} = m_{vod}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky ke stanovení zkušební látky při desorpční rovnováze (cm^3),

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3).

Freundlichova desorpční rovnice je (16):

$$C_p^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{vod}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (16)$$

nebo v lineární formě:

$$\log C_p^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{des}(eq) \quad (17)$$

kde:

K_F^{des} = Freundlichův desorpční koeficient,

n = regresní konstanta,

$C_{vod}^{des}(eq)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze (μg/cm).

Rovnice 16 a 17 se znázorní graficky a hodnoty K_F^{des} a 1/n se vypočítají regresní analýzou z rovnice 17.

Poznámka:

Je-li Freundlichův adsorpční nebo desorpční exponent 1/n roven 1, bude Freundlichova adsorpční nebo desorpční konstanta (K_F^{ads} a K_F^{des}) rovna adsorpční resp. desorpční rovnovážné konstantě (K_d a K_{des}) a závislosti C_p na C_{vod} budou lineární. Nejsou-li exponenty rovny 1, závislosti C_p na C_{vod} budou nelineární a adsorpční a desorpční konstanty se budou podél isotherm lišit.

2.2.2. **Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto informace:

— úplná identifikace použitých půdních vzorků včetně:

— zeměpisných parametrů lokality (zeměpisné šířky, zeměpisné délky),

— údaje odběru vzorku,

▼B

— využití půdy (např. zemědělská půda, lesní půda atd.),

— hloubky odběru vzorků,

— obsahu písku/prachových částic/jílu,

— pH (v 0,01 M $CaCl_2$),

— obsahu organického uhlíku,

— obsahu organického materiálu,

— obsahu dusíku,

— poměru C/N,

— kationtové výměnné kapacity (mmol/kg),

— všech informací týkajících se sběru a uchovávání vzorků,

— všech významných informací pro interpretaci adsorpce/desorpce zkoušené látky,

— odkazu na metody reference použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— podle potřeby informace o zkoušené látce,

— teplota při experimentu,

— podmínky centrifugace,

— analytický postup použitý při analýze zkoušené látky,

— odůvodnění jakéhokoli použití solubilizačního činidla při přípravě zásobního roztoku zkoušené látky,

— vysvětlení korekcí provedených ve výpočtech, je-li to důležité,

— údaje podle formuláře (dodatek 6) a grafická znázornění,

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků zkoušky.

3. **LITERATURA**

1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, str. 83–122.

14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, str. 31–44.

15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29–35.

16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 185–190.

18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, 524–528.

19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901–932.

▼B

21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, str. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric., 18, 269–273.

23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45–52.

24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961–971.

25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247–258.

26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143–154.

27) Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), str. 135-172, Plenum Press, NY.

28) Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732–210.

29) Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49–143.

30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37–44.

31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297–325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339–357.

33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, 340–350.

34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, 389–395.

35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, str. 80–101,

36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572–576.

▼B

37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, 667–668.

38) Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

39) Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, 243–246.

41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, 29–92.

42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: 222–234.

43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, 833–846.

44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, 1–17.

45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, str. 49–143.

46) Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19: 67–69.

47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, 454–457.

48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, 353–354.

60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., 109–138.

61) Boesten, J.J.T.I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, 31–41.

62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“ Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26–29 April 1994.

63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, 227–231.

64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual., 10(3), 382–386.

65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227–231.

66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297–312.

67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), 109–116.

68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), str.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, 831–832.

71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38–42.

72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), 833–846.

73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité. Revue de l'Agric.“, 34 (4), 319–322.

74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), 1373–1384.

76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), 2341–2352.

77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, str. 29–36.

78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297–325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80) Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14–32.

81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc., 3973–93.

82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31: 239–251.

83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13–15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

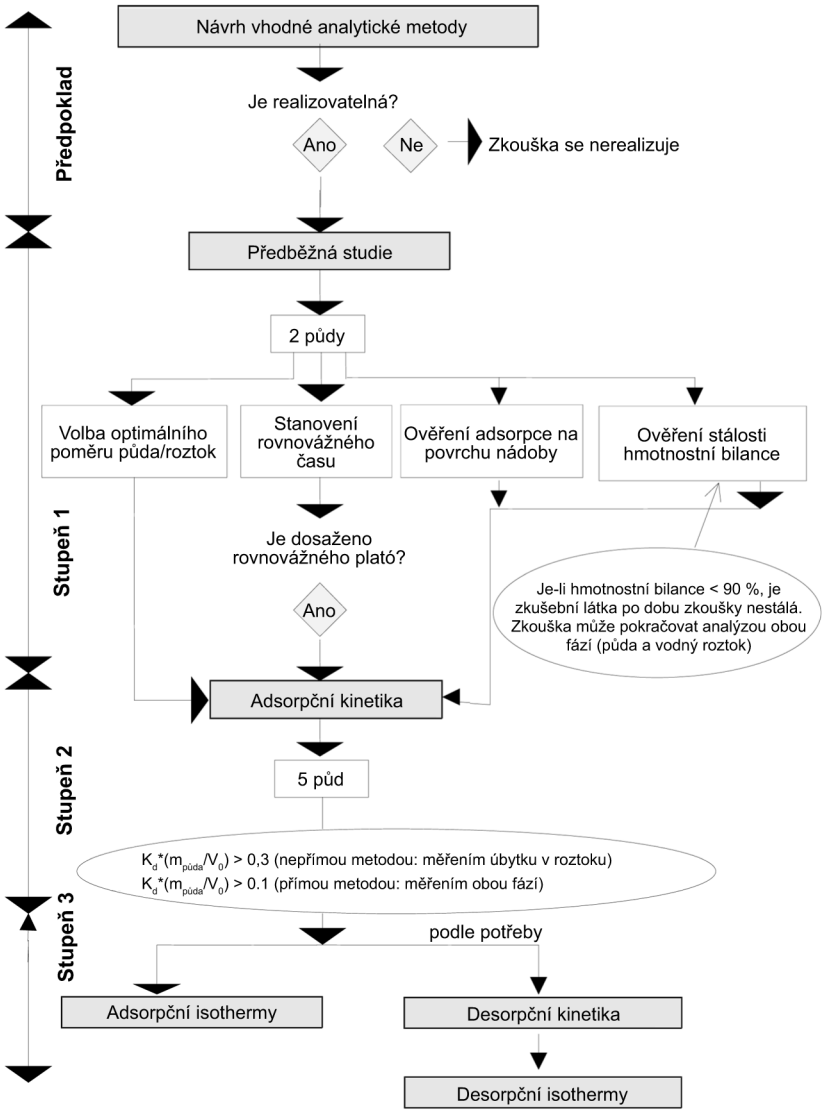
84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26: 305 (1962).

▼B

DODATEK 1

Schéma zkoušky



▼B

DODATEK 2

VLIV SPRÁVNOSTI ANALYTICKÉ METODY A ZMĚNY KONCENTRACE NA SPRÁVNOST VÝSLEDKŮ ADSORPČNÍ STUDIE

Z následující tabulky (84) je zřejmé, že je-li rozdíl mezi počáteční hmotností zkoušené látky (m_0 = 110 µg) a její rovnovážnou hmotností v roztoku ($m_{aq}^{ads}(eq)$-=100 µg) velmi malý, je důsledkem 5 % chyby měření rovnovážné koncentrace 50 % chyba ve výpočtu hmotnosti zkoušené látky adsorbované v půdě ($m_p^{ads}(eq)$) a 52,4 % chyba ve výpočtu K_d.

Hmotnost půdy $m_{půda}$ = 10 g

Objem roztoku V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)*$ (µg)	$C_s^{ads}(eq)*$ (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PRO A = 9 %							
m_0 = 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	skutečná hodnota	10	1,00	skutečná hodnota	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PRO A = 55 %							
m_0 = 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	skutečná hodnota	60,0	6,00	skutečná hodnota	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PRO A = 99 %							
m_0 = 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	skutečná hodnota	108,9	10,89	skutečná hodnota	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{vod}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{půda}},\ Kd = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{vod}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{půda}}$$

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v půdě při rovnováze, µg;

$m_v^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, µg;

$C_p^{ads}(eq)$ = množství zkoušené látky v půdě při rovnováze, µg g^{-1};

$C_v^{ads}(eq)$ = množství zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, µg cm^{-3};

R = analytická chyba stanovení $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = vypočtená chyba způsobená analytickou chybou R.

▼B

DODATEK 3

METODY ODHADU K_D

1. Metody odhadu umožňují předpovědět K_d na základě korelací například s hodnotami P_{ow} (12, 39, 63–68), s údaji o rozpustnosti ve vodě (12, 19, 21, 39, 68–73) nebo s údaji o polaritě získanými při použití HPLC s obrácenou fází (74–76). Jak je ukázáno v tabulkách 1 a 2, vypočtou se z takových rovnic hodnoty K_{ou} nebo K_{om} a poté nepřímo hodnoty $K_{d\ z}$ rovnic:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%ou} (cm^3 g^{-1})$$

2. Koncepce těchto korelací je založena na dvou předpokladech: 1) adsorpci látky nejvíce ovlivňuje organický materiál v půdě a 2) interakce jsou převážně nepolární. V důsledku toho tyto korelace: 1) nejsou použitelné pro polární látky (nebo jsou použitelné jen do určité míry) a 2) nejsou použitelné v případech, kdy je obsah organického materiálu v půdě velmi malý (12). Kromě toho, ačkoli byla zjištěna uspokojivá korelace mezi P_{ov} a a adsorpcí (19), nelze totéž říci o vztahu mezi rozpustností ve vodě a rozsahem adsorpce (19, 21); dosud si tyto studie protiřečí.

3. Některé příklady korelace mezi adsorpčním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu a rovněž rozpustností ve vodě jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu; další příklady jsou uvedeny v literatuře (12, 68)

Látky	Korelace	Autoři
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{o/v}$	Briggs (1981) (39)
Chlorované aromatické	$\log K_{ou} = - 0,779 + 0,904 \log P_{o/v}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{o/v}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhlovodíky	$\log K_{ou} = - 2,53 + 1,15 \log P_{o/v}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabulka 2

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozpustností ve vodě; další příklady jsou uvedeny v literatuře (68, 69)

Sloučeniny	Korelace	Autoři
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 3,8 – 0,561 \log S_v$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Chlorované alifatické a aromatické látky	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) – (0,557 \pm 0,012) \log S_v$	Chiou *et al*. (1979) (70)
1-Naftol	$\log K_{ou} = 4,273 – 0,686 \log S_v \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cyklické, alifaticko-aromatické látky	$\log K_{ou} = - 1,405 – 0,921 \log S_v - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Různé sloučeniny	$\log K_{om} = 2,75 – 0,45 \log S_v$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATEK 4

VÝPOČTY PRO URČENÍ PODMÍNEK CENTRIFUGACE

1. Centrifugační doba se za předpokladu, že jsou částice kulové, vypočte podle této rovnice:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_p - \rho_{vod})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Pro zjednodušení nejsou parametry uvedeny v základních jednotkách SI (ale v jednotkách soustavy CGS).

kde:

ω = úhlová rychlost (= 2 π·(rpm)/60), rad/s,

rpm = počet otáček za minutu,

η = viskozita roztoku, $g \cdot s^{-1}/cm$,

r_p = poloměr částic, cm,

ρ_p = hustota půdy, g/cm^3,

ρ_{vod} = hustota roztoku, g/cm^3,

R_t = vzdálenost od středu rotoru odstředivky k hladině roztoku v centrifugační kyvetě, cm,

R_b = vzdálenost od středu rotoru odstředivky ke dnu kyvety, cm,

$R_b - R_t$ = výška sloupce směsi půda/roztok v kyvetě, cm.

Všeobecně se v praxi k zajištění úplného oddělení volí dvojnásobek vypočteného času.

2. Rovnici (1) lze dále zjednodušit, jestliže se považují viskozita (η) a hustota (ρ_{vod}) roztoku rovny viskozitě a hustotě vody při 25 °C; tedy, $\eta = 8{,}95 \times 10–3g\ s^{-1}/cm$ a $\rho_{vod} = 1{,}0\ g/cm^{-3}$.

Centrifugační doba je tedy dána rovnicí (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^{\,2}(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Z rovnice 2 je zřejmé, že při určení podmínek centrifugace k dosažení separace částic o určité velikosti (v našem případě o poloměru 0,1 μm), doby (t) počtu otáček za minutu (rpm), jsou důležité: 1) hustota půdy a 2) výška sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$), tj. vzdálenost, kterou částice půdy urazí mezi hladinou v kyvetě a jejím dnem; výška sloupce směsi v kyvetě bude při fixním stanoveném objemu samozřejmě záviset na druhé mocnině poloměru kyvety.

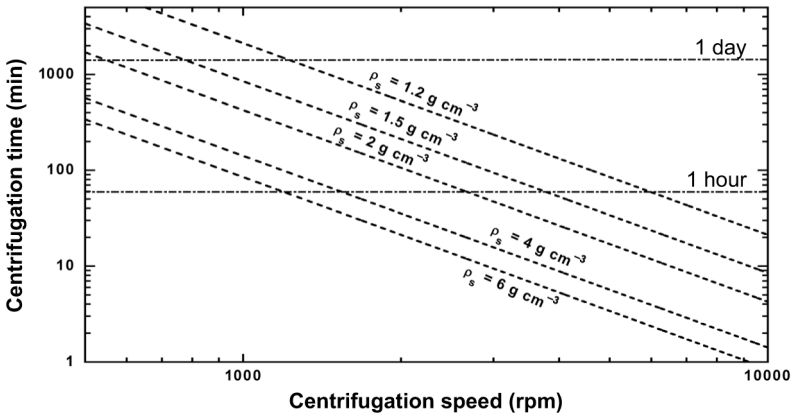
4. Na obrázku 1 jsou znázorněny změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (rpm) pro různé hustoty půdy (ρ_s) (obrázek 1a) a pro různé výšky sloupce směsi v centrifugačních kyvetách (obrázek 1b). Z obrázku 1a je zřejmý vliv hustoty půdy; např. při obvyklých 3 000 ot/min. je centrifugační doba přibližně 240 minut pro hustotu půdy 1,2 g/cm3, ale pouze 50 minut pro 2,0 g/cm3.Podobně je podle obrázku 1b při obvyklých 3 000 ot/min. centrifugační doba přibližně 50 minut pro výšku sloupce směsi 10 cm a pouze 7 minut pro výšku sloupce 1 cm. Je však důležité nalézt optimální poměr mezi centrifugací, která vyžaduje co nejmenší výšku sloupce, a snadnou manipulaci experimentátora při oddělování fází po centrifugaci.

▼B

5. Kromě toho je při určování experimentálních podmínek při separaci fází půda/roztok důležité zvažovat možnou přítomností třetí „pseudofáze“, koloidu. Koloidní částice s velikostí menší než 0,2 μm, mohou mít značný vliv na celý mechanismus adsorpce látky v půdní suspensi. Při centrifugaci, jak je popsána výše, zůstanou koloidní částice ve vodné fázi a analyzují se společně s vodnou fází. Informace o jejich vlivu se tedy ztratí.

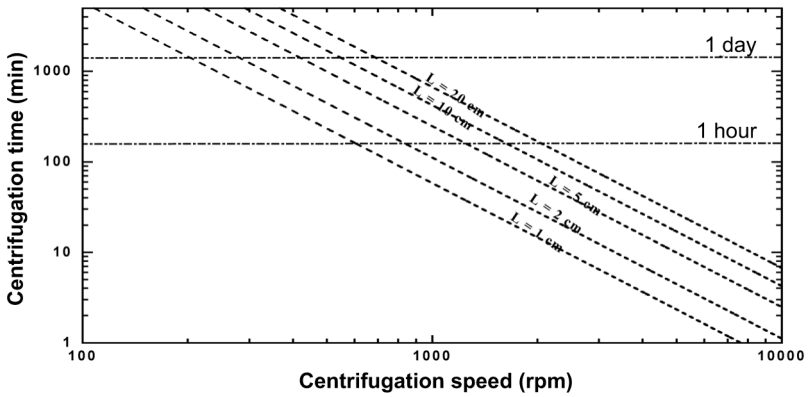
   Má-li laboratoř, která studii provádí, zařízení pro ultracentrifugaci nebo ultrafiltraci, mohly by být adsorpce/desorpce látky v půdě studovány hlouběji včetně informací o adsorpci látky na koloidních částicích. v takovém případě by k oddělení tří fází – půdy, koloidních částic a roztoku měla být použita ultracentrifugace při 60 000 ot/min. nebo ultrafiltrace na filtru o porositě 100 000 Da. Protokol o zkoušce by měl být také odpovídajícím způsobem pozměněn, mají-li být analyzovány všechny tři fáze.

Obrázek 1a



Změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min.) pro různé hustoty půdy (ρ_p). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g·s^{-1}/cm a ρ_{vod} = 1,0 g/cm^3 při 25 °C.

Obrázek 1b



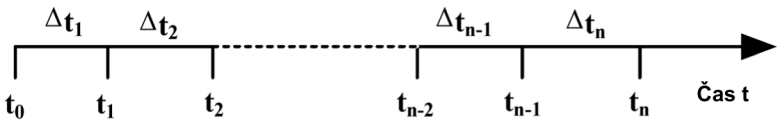
Změna centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min) pro různé výšky sloupce směsi v centrifugační kyvetě (R_b – R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10–3 gs^{-1}/cm, ρ_{vod} = 1,0 g/cm^3 při 25 °C a ρ_p = 2,0 g/cm^3.

▼B

DODATEK 5

VÝPOČET ADSORPCE A (%) A DESORPCE D (%)

Časové schéma postupu je toto:



U všech výpočtů se předpokládá, že zkoušená látka je stálá a že se významně neadsorbuje na stěnách nádobky.

ADSORPCE A (%)

a) *Paralelní metoda*

Procento adsorpce se vypočte pro každou zkušební nádobku (i) pro každý čas (t_i), podle této rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Veličiny v této rovnici lze vypočítat takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_p^{ads}(t_i) = m_0 - C_{vod}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kde:

A_{t_i} = procento adsorpce (%) v čase t_i,

$m_p^{ads}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky v půdě v čase t_i, kdy je prováděna analýza (μg)

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg),

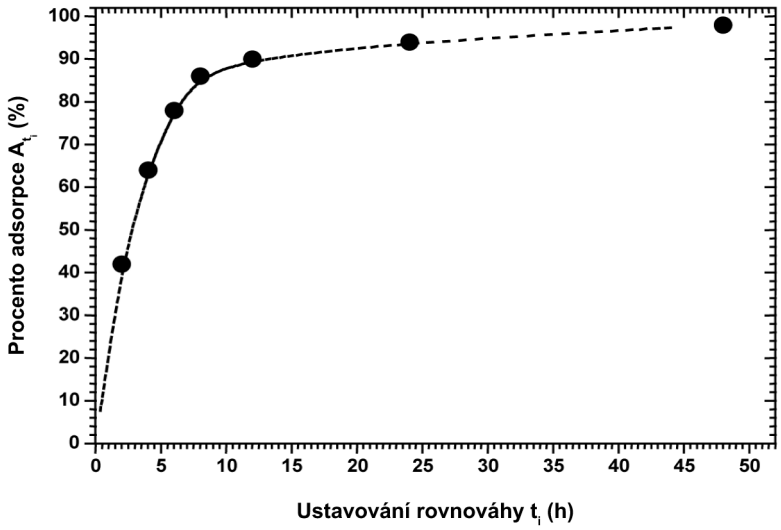
C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (μg/cm),

▼B

$C_{vod}^{ads}(t_i)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase $_i$, kdy je prováděna analýza (µg/cm); tato koncentrace se stanoví analyticky, přičemž se vezmou v úvahu hodnoty ze slepých pokusů,

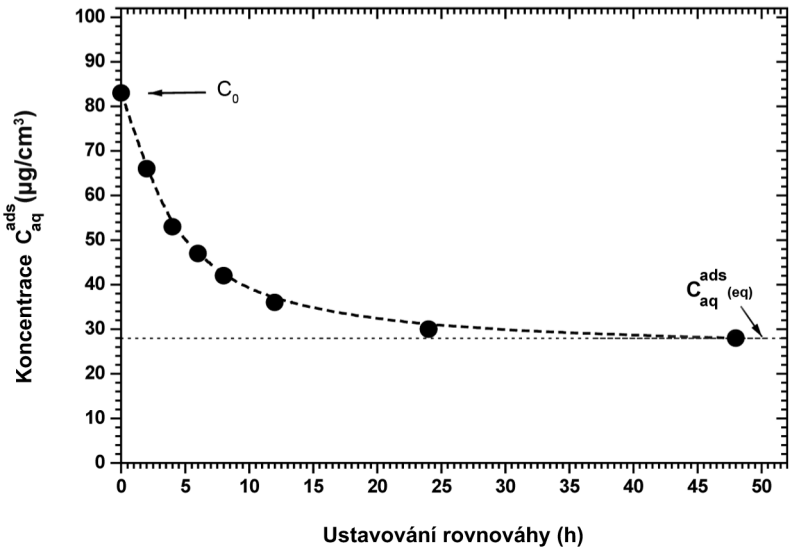
V_0 = počáteční objem zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (cm^3).

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $C_{vod}^{ads}(t_i)$ se vynesou do grafu proti času a zjistí se doba potřebná k ustavení sorpční rovnováhy. Příklady takových výnosů jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2.



Obrázek 1

Ustavování adsorpční rovnováhy



Obrázek 2

Závislost hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi (C_{aq}) na čase

▼B

b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že se při studii adsorpce provádějí měření zkoušené látky v malých podílech vodné fáze v určitých časových intervalech.

— Pro každý časový interval se hmotnost látky adsorbované v půdě vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \tag{4}$$

— pro druhý časový interval $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \tag{5}$$

— pro třetí časový interval $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_p^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \tag{6}$$

— pro ntý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \tag{7}$$

— Procento adsorpce v každém časové intervalu $A_{\Delta t_i}$ se vypočte za použití rovnice:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \tag{8}$$

zatímco procento adsorpce A_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \tag{9}$$

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou do grafu proti času a určí se čas, kdy se ustavila sorpční rovnováha.

— V čase ustavení rovnováhy t_{eq}:

— je hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě:

$$m_p^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_p^{ads}(\Delta t_i) \tag{10}$$

▼B

— hmotnost zkoušené látky v roztoku:

$$m_{vod}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_p^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a procento adsorpce při rovnováze:

$$A_{eq} = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Výše uvedené parametry jsou definovány takto:

$m_p^{ads}(\Delta t_1), m_p^{ads}(\Delta t_2), ..., m_p^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky adsorbované v půdě v časovém intervalu Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} respectively (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$ = hmotnost látky naměřené v podílu v_a^A v okamžiku t_1, t_2,t_n respectively (μg);

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

v_a^A = objem podílu, ve kterém je látka stanovována (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = procento adsorpce odpovídající časovému intervalu Δt_i (%),

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze (%).

DESORPCE D (%)

Časem t_0 v němž začíná experiment pro studium desorpční kinetiky, je okamžik, kdy je co největší objem roztoku zkoušené látky (po dosažení adsorpční rovnováhy) nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$.

a) *Paralelní metoda*

V čase t_i se změří hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi odebrané ze zkušební nádobky i (V_r^i) a desorbovaná hmotnost se vypočte z rovnice:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{vod}^{A} \quad (13)$$

Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{eq}$, a tedy $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

Hmotnost zkoušené látky desorbované v časovém intervalu (Δt_i) je dána rovnicí:

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_i) = m_{vod}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{vod}^{des}(j) \quad (14)$$

Procento desorpce se vypočte takto:

včase t_i z rovnice:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

a v časovém intervalu (Δt_i) z rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

kde:

D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = procento desorpce v časovém intervalu Δt_i (%);

$m_{vod}^{des}(t_1)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_{vod}^{des}(\Delta t_1)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky analyticky stanovená v čase t_i v roztoku o objemu V_r^i, který byl odebrán k analýze (μg);

m_{vod}^{A} = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m_{vod}^{A} = m_{vod}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky (i) ke stanovení zkoušené látky v experimentu pro studium desorpční kinetiky (cm^3).

Hodnoty procenta desorpce D_{t_i} nebo $D_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou proti času a stanoví se doba, po níž se ustavila desorpční rovnováha.

b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že adsorpce, která předcházela, byla prováděna měřením zkoušené látky v malých podílech (v_a^A) vodné fáze (sériová metoda v bodu 1.9 Provedení zkoušky). Předpokládá se, že a) objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po experimentu pro studium adsorpční kinetiky byl nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (V_R) a b) celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (V_T) zůstává konstantní během pokusu na získání desorpční kinetiky a je vyjádřená rovnicí:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

V čase t_i:

— Hmotnost zkoušené látky se změří v malých podílech (v_a^D) a desorbovaná hmotnost se vypočte z této rovnice:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{eq}$ a tedy $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

— Procento desorpce D_{t_i} se vypočte z této rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

V časovém intervalu (Δt_i):

Pro každý časový interval se desorbované množství látky vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \text{ and } m_p^{des}(t_1) = m_p^{vod}(eq) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ a}$$

$$m_p^{des}(t_2) = m_p^{ads}(eq) - \left[m_{vod}^{des}(\Delta t_1) + m_{vod}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— pro n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{vod}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ a}$$

$$m_p^{des}(t_n) = m_p^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{vod}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Procento desorpce v každém časovém intervalu $D_{\Delta t_i}$ se nakonec vypočte z této rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

zatímco procento desorpce D_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t^i} m_{vod}^{des}(j)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

přičemž jsou použité veličiny definovány takto:

$m_p^{des}(\Delta t_1)$, $m_p^{des}(\Delta t_2)$,..., $m_p^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po časových intervalech Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg);

$m_p^{des}(\Delta t_1)$, $m_p^{des}(\Delta t_2)$,..., $m_p^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky desorbované v časových intervalech Δt_1, Δt_2,..., Δt_n resp. (μg);

$m_p^{des}(t_1)$, $m_p^{des}(t_2)$,..., $m_p^{des}(t_n)$ = hmotnost látky naměřená v podílu (v_a^D) v časových intervalech t_1, t_2,..., t_n, resp. (μg);

V_T = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během experimentu pro studium desorpční kineticky provedeného sériovou metodou (cm^3);

m_{vod}^A = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m_{vod}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{vod}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3);

v_a^D = objem alikvotu odebraného k analýze ze zkušební nádobky (i) během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATEK 6

ADSORPCE – DESORPCE V PŮDÁCH: FORMULÁŘE PRO PŘEDLOŽENÍ ÚDAJŮ

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Použitelnost analytické metody

Navážka půdy	g	
Půda: suchá hmotnost	g	
Objem roztoku $CaCl_2$	cm^3	
Nominální koncentrace konečného roztoku	$\mu g/cm^3$	
Analytická koncentrace konečného roztoku	$\mu g/cm^3$	

Podstata použité analytické metody:

Kalibrace analytické metody:

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá ☐ Paralelní ☐ Sériová ☐

Přímá ☐

Adsorpční zkouška: zkušební vzorky

	Symbol	Jednotky	Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy	
Zkušební nádobka č.										
Navážka půdy	—	g								
Půda: suchá hmotnost	$m_{půda}$	g								
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm^3								
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm^3								
Objem zásobního roztoku		cm^3								
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm^3								
Počáteční koncentrace zkušebního roztoku	C_0	$\mu g/cm^3$								
Hmotnost zkoušené látky na začátku zkoušky	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Jednotky	Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy	
Po protřepávání a centrifugaci										
NEPŘÍMÁ METODA										
Paralelní metoda										
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{vod}^{ads}(t_i)$	µg/cm^3								
Sériová metoda										
Naměřená hmotnost zkoušené látky v podílu	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
PŘÍMÁ METODA										
Hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě	$m_p^{ads}(t_i)$	µg								
Výpočet adsorpce										
Adsorpce	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Střední hodnota										
Adsorpční koeficient	K_d	cm^3/g								
Střední hodnota										
Adsorpční koeficient	K_{ou}	cm^3/g								
Střední hodnota										

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Adsorpční zkouška: slepý pokus a kontrolní vzorky

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Zkušební nádobka č.								
Navážka půdy		g					0	0
Množství vody v navážce půdy (vypočtené)		cm^3					—	—
Přidaný objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$		cm^3						
Přidaný objem zásobního roztoku zkoušené látky		cm^3	0	0				
Celkový objem vodné fáze (vypočtený		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Počáteční koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi		µg/cm^3						
Po protřepávání a centrifugaci								
Koncentrace ve vodné fázi		µg/cm^3						

Poznámka: Podle potřeby lze přidat sloupce.

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Hmotnostní bilance

	Symbol	Jednotky				
Zkušební nádobka č.						
Navážka půdy	—	g				
Půda: suchá hmotnost	$m_{půda}$	g				
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	ml				
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		ml				
Objem zásobního roztoku		cm^3				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm^3				
Počáteční koncentrace zkušebního roztoku	C_0	µg/cm^3				
Doba ustavování rovnováhy	—	h				
Po protřepávání a centrifugaci						
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze, po korekci na slepý pokus	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg/cm^3				
Rovnovážná doba	t_{eq}	h				
První zředění rozpouštědlem						
Odebraný objem vodné fáze	V_{rec}	cm^3				
Přidaný objem rozpouštědla	ΔV	cm^3				
První extrakce rozpouštědlem						
Signál při analýze rozpouštědla	S_{E1}	var.				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E1}	µg/cm^3				

▼B

	Symbol	Jednotky				
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádobky	m_{E1}	µg				
Druhé zředění rozpouštědlem						
Odebraný objem rozpouštědla	V_{rozp}	cm^3				
Přidaný objem rozpouštědla	V'	cm^3				
Druhá extrakce rozpouštědlem						
Signál při analýze rozpouštědlové fáze	S_{E2}	var.				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E2}	µg/cm^3				
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádobky	m_{E2}	µg				
Celková hmotnost zkoušené látky extrahované ve dvou stupních	m_E	µg				
Hmotnostní bilance	MB	%				

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Adsorpční isothermy

	Symbol	Jednotky								
Zkušební nádobka č.										
Navážka půdy	—	g								
Půda: suchá hmotnost	E	g								
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm^3								
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm^3								
Přidaný objem zásobního roztoku		cm^3								
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (vypočtený)	V_0	cm^3								
Koncentrace roztoku	C_0	µg/cm^3								
Doba ustavování rovnováhy	—	h								

▼B

	Symbol	Jednotky								
Po protřepávání a centrifugaci										
Koncentrace látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{vod}^{ads}(eq)$	µg/cm^3								
Teplota		°C								
Adsorbovaná hmotnost na jednotku množství půdy	$C_p^{ads}(eq)$	µg/g								

Regresní analýza:

hodnota:

hodnota l/n:

regresní koeficient r^2:

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): ..... %

Teplota: ..... °C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá ☐ Paralelní ☐ Sériová ☐

Desorpční zkouška

		Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Číslo zkušební nádobky z adsorpčního experimentu							
Hmotnost látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze		$m_p^{ads}(eq)$	µg				
Odebraný objem vodné fáze nahrazený 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Hmotnost látky zbylé z rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze		m_{vod}^A	µg				

Desorpční kinetika

Naměřená hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Objem roztoku odebraný ze zkušební nádobky (i) pro měření zkoušené látky	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i (vypočtená)		$m_{vod}^{des}(t_i)$	µg				
Hmotnost látky desorbované z půdy během časového intervalu (vypočtená)		$m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Procento desorpce						
Desorpce v čase t_i	D_{ti}	%				
Desorpce v časovém intervalu	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdánlivý desorpční koeficient	K_{des}					

PM: paralelní metoda

SM: sériová metoda

▼B

C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{OU}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG121 (2000).

1.1. ÚVOD

Sorpční chování látek v půdách a v čistírenských kalech může být popsáno parametry experimentálně stanovenými zkušební metodou C.18. Důležitým parametrem je adsorpční koeficient, který je definován jako poměr koncentrace látky v půdě nebo kalu a koncentrace látky ve vodné fázi při rovnováze. Adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku v půdě K_{ou} je užitečným ukazatelem schopnosti chemické látky vázat se na organické látky v půdě a v čistírenském kalu a umožňuje porovnat různé chemické látky. Tento parametr lze odhadnout z korelace s rozpustností ve vodě a s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Experimentální metoda popsaná v této zkoušce používá k odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} v půdě a v čistírenských kalech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (8). Tyto odhady jsou spolehlivější než odhady z výpočtů metodikou QSAR (9). Jako metoda odhadu nemůže plně nahradit šaržovitou rovnovážnou metodu použitou v metodě C.18. Odhady K_{ou} však mohou být užitečné pro volbu vhodných parametrů pro adsorpční/desorpční studie podle zkušební metody C.18, a to výpočtem K_d (distribučního koeficientu) nebo K_f (Freundlichova adsorpčního koeficientu) z rovnice 3 (viz bod 1.2).

1.2. DEFINICE

K_d: Distribuční koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací C rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému skládajícím se ze sorbentu (půda nebo čistírenský kal) a vodné fáze; je bezrozměrný, jsou-li koncentrace v obou fázích vyjádřeny na hmotnostním základě. Je-li koncentrace ve vodné fázi vyjádřena na základě hmotnost/objem, je jednotkou ml/g. K_d se může měnit s vlastnostmi sorbentu a může záviset na koncentraci.

$$K_d = \frac{C_{půda}}{C_{vod}} \text{ nebo } \frac{C_{kal}}{C_{vod}} \quad (1)$$

kde:

$C_{půda}$ = koncentrace zkoušené látky v půdě při rovnováze (μg/g);

C_{kal} = koncentrace zkoušené látky v kalu při rovnováze (μg/g);

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze (μg/g, μg/ml).

▼B

K_f: Freundlichův adsorpční koeficient je definován jako koncentrace zkoušené látky v půdě nebo v čistírenském kalu (x/m), je-li rovnovážná koncentrace C_{vod} ve vodné fázi rovna jedné; vyjadřuje se v μg/g sorbentu. Hodnota se může měnit s vlastnostmi sorbentu.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{vod} \quad (2)$$

kde:

x/m = množství zkoušené látky x (μg) adsorbované při rovnováze na určitém množství sorbentu m (g);

1/n = směrnice Freundlichovy adsorpční isothermy;

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze (μg/ml).

Při $C_{vod} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$

K_{ou}: Distribuční koeficient (K_d) nebo Freundlichův adsorpční koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíku (f_{ou}) v sorbentu; zejména u neionizovatelných chemických látek je přibližným ukazatelem míry adsorpce látky na sorbentu a umožňuje provést porovnání různých chemických látek. V závislosti na rozměru K_d a K_f, K_{ou} může být bezrozměrný nebo může být jeho jednotkou ml/g nebo μg/g organického materiálu.

$$Kou = \frac{Kd}{fou}((\text{bezrozměrný nebo v ml/g})) \text{ nebo } \frac{Kf}{fou}(\mu g/g) \quad (3)$$

Vztah mezi K_{ou} a K_d není vždy lineární a hodnoty K_{ou} se mohou pro jednotlivé půdy měnit, avšak jejich změny jsou značně omezeny ve srovnání s hodnotami K_d nebo K_f.

Adsorpční koeficient (K_{ou}) lze odečíst pomocí kapacitního faktoru (k') z kalibrační křivky log k' versus log K_{ou} pro vybrané referenční sloučeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = retenční časy zkoušené a referenční látky v HPLC (min)

t_0 = mrtvý čas HPLC (min) (viz bod 1.8.2).

P_{OV}: Rozdělovací koeficient oktanol/voda je definován jako poměr koncentrací rozpuštěné látky v oktan-1-olu a ve vodě; je bezrozměrný.

$$P_{o/v} = \frac{C_{oktanol}}{C_{voda}}(= K_{o/v}) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Před použitím metody by měly být známy strukturní vzorec, čistota a disociační konstanta (pokud existuje). Užitečné jsou informace o rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech, o rozdělovacím koeficientu oktanol-voda a o hydrolýze.

▼B

Mají-li se korelovat naměřené retenční údaje z HPLC pro zkoušenou látku s jejím adsorpčním koeficientem, musí být sestrojen kalibrační graf log K_{ou}, K_{ou} versus log k'. Použije se minimálně šest referenčních bodů, alespoň po jednom nad a pod očekávanou hodnotou pro zkoušenou látku. Správnost metody se významně zlepší, budou-li použity referenční látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka. Nejsou-li takové údaje k dispozici, ponechává se na uživateli, aby vybral vhodné kalibrační látky. V takovém případě by měla být vybrán obecnější soubor strukturně heterogenních látek. Látky a jejich hodnoty K_{ou}, které mohou být použity, jsou uvedeny v dodatku, a to v tabulce 1 pro čistírenský kal a v tabulce 3 pro půdu. Volba jiných kalibračních látek by měla být zdůvodněna.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou kyanopropylovou stacionární fází obsahující lipofilní a polární skupiny. Použije se mírně polární stacionární fáze na silikagelové matrici:

— O – Si	— CH_2 – CH_2 – CH_2	— CN
silikagel	nepolární spojka	polární skupina

Podstata zkušební metody je obdobná jako ve zkušební metodě A.8 (rozdělovací koeficient, metoda HPLC). Při průchodu kolonou s mobilní fází zkoušená látka interaguje se stacionární fází. V důsledku distribuce mezi mobilní a stacionární fází se postup zkoušené látky zpomaluje. Dvojí složení stacionární fáze s polárními a nepolárními místy umožňuje interakci polárních a nepolárních skupin molekuly podobně jako v organickém materiálu v půdě nebo v matrici čistírenského kalu. To umožňuje stanovit vztah mezi retenčním časem v koloně a adsorpčním koeficientem na organickém materiálu.

pH má významný vliv na sorpční chování zejména u polárních látek. U zemědělských půd nebo nádrží s čistírenskými kaly se pH normálně pohybuje od pH 5,5 do 7,5. U ionizovatelných látek se ve vhodném pufru provedou dvě zkoušky, a to jak s ionizovanou formou, tak s neionizovanou formou, avšak pouze v případě, že v rozmezí pH 5,5 až 7,5 je ionizováno alespoň 10 % zkoušené sloučeniny.

Vzhledem k tomu, že se k hodnocení použije pouze vztah mezi retencí na koloně HPLC a adsorpčním koeficientem, není nutná žádná kvantitativní metoda, nýbrž pouze stanovení retenčního času. Je-li k dispozici vhodný soubor referenčních látek a lze-li užít standardní experimentální podmínky, poskytuje metoda rychlý a účinný způsob odhadu adsorpčního koeficientuK_{ou}.

1.5. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Metoda HPLC je použitelná pro chemické látky (isotopově značené i neznačené), pro něž je k dispozici vhodný detekční systém (např. spektrofotometr, detektor radioaktivity) a jež jsou po dobu experimentu dostatečně stálé. Může být zvláště užitečná pro chemické látky, jejichž studium je v jiných experimentálních systémech obtížné (pro těkavé látky, látky, které nejsou rozpustné ve vodě v koncentraci, kterou lze analyticky měřit, pro látky s vysokou afinitou k povrchu inkubačních systémů). Metoda může být použita pro směsi, které dávají nerozlišitelné eluční pásy. v takovém případě se stanoví horní a dolní meze hodnot log K_{ou} pro sloučeniny přítomné ve směsi.

▼B

Nečistoty mohou někdy působit problémy při interpretaci výsledků HPLC, ale ty nejsou příliš důležité, neboť zkoušené látky lze jasně analyticky identifikovat a oddělit od nečistot.

Metoda je validována pro látky uvedené v tabulce 1 v dodatku a byla rovněž použita u řady jiných chemických látek z těchto chemických tříd:

— aromatické aminy (např. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naftylamin),

— estery aromatických karoxylových kyselin (např. methyl-benzoát, ethyl-3,5-dinitrobenzoát),

— aromatické uhlovodíky a deriváty (např. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen),

— estery aryloxyfenoxypropanové kyseliny (např. diklofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),

— benzimidazolové a imidazolové fungicidy (např. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),

— amidy karboxylových kyselin (např. 2-chlorbenzamid, N,N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— chlorované uhlovodíky (např. endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, kvintozen, 1,2,3-trichlorbenzen),

— organofosforové insekticidy (např. azinfosmethyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos),

— fenoly (např. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 1-naftol),

— deriváty fenylmočoviny (např. isoproturon, monolinuron, pencykuron),

— pigmentová barviva (např. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— polyaromatické uhlovodíky (např. acenaften, naftalen),

— 1,3,5-triazinové herbicidy (např. prometryn, propazin, simazin, terbutryn),

— triazolové deriváty (např. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoda není použitelná pro látky, které reagují s eluentem nebo stacionární fází. Rovněž není použitelná pro látky, které interagují specifickým způsobem s anorganickými složkami (např. tvoří klastrové komplexy s minerály jílu). Metoda nemusí fungovat pro povrchově aktivní látky, anorganické sloučeniny a pro středně silné nebo silné organické kyseliny a zásady. Lze stanovit hodnotu log K_{ou} od 1,5 do 5,0. Ionizovatelné látky musí být měřeny s pufrovanou mobilní fázi, avšak je třeba dbát na to, aby se předešlo srážení složek pufru nebo zkoušené látky.

▼B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

1.6.1. **Správnost**

Obvykle lze adsorpční koeficient zkoušené látky stanovit v rozmezí +/- 0,5 řádu hodnoty stanovené šaržovitou rovnovážnou metodou (viz tabulka 1 v dodatku). Vyšší správnosti lze dosáhnout, pokud jsou použité referenční látky strukturně příbuzné se zkoušenou látkou.

1.6.2. **Opakovatelnost**

Stanovení se provedou alespoň dvakrát. Hodnoty log K_{ou} získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,1.

1.6.3. **Reprodukovatelnost**

Dosud získané zkušenosti s použitím metody potvrzují její validitu. Ověřování metody HPLC za použití 48 látek (převážně pesticidů), u nichž byly k dispozici spolehlivé údaje o K_{ou} v půdě, vedlo ke korelačnímu koeficientu R = 0,95 (10, 11).

Pro zlepšení a validaci metody bylo proveden mezilaboratorní srovnávací test za účasti 11 laboratoří (12). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 v dodatku.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. **Předběžný odhad adsorpčního koeficientu**

Rozdělovací poměr oktanolvoda P_{ov} (= K_{ov}) a do určité míry i rozpustnost ve vodě lze použít jako indikátory rozsahu adsorpce zejména u neionizovaných látek, a mohou tedy být použity pro jeho předběžné určení. Pro různé skupiny chemických látek byla publikována řada užitečných korelací (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.7.2. **Přístroje a pomůcky**

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovací smyčkou. Použije se komerční fáze s vázanými kyanopropylovými skupinami na silikagelu (např. Hypersil a Zorbax CN). Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna předkolona ze stejného materiálu. Kolony od různých dodavatelů se mohou podstatně lišit, pokud jde o účinnost. Jako vodítko by měly být dosaženy následující kapacitní faktory: log k' > 0,0 pro log K_{ou} = 3,0 a log k' > – 0,4 pro log K_{ou} = 2,0 při použití směsi methanol/voda 55/45 % jako mobilní fáze.

1.7.3. **Mobiní fáze**

Bylo testováno několik mobilních fází a doporučují se tyto dvě mobilní fáze:

— methanol/voda (55/45 % obj.),

— methanol/0,01 M citrátový pufr pH 6,0 (55/45 % obj.).

▼B

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol a voda nebo citrátový pufr, vše čistoty pro HPLC. Směs se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Nevyhovuje-li směs methanol/voda, lze vyzkoušet směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. směsi ethanol/voda nebo acetonitril/voda. U ionizovatelných sloučenin se doporučuje použití pufru ke stabilizaci pH. Je nezbytné dbát na to, aby se zamezilo srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufrem.

Nesmí být použity žádné přísady, jako jsou iontově párová činidla, neboť mohou ovlivnit sorpční vlastnosti stacionární fáze. Takové změny mohou být nevratné. Z tohoto důvodu musí být experimenty s použitím přísad prováděny na zvláštních kolonách.

1.7.4. **Rozpuštěné látky**

Zkoušené a referenční látky se rozpustí v mobilní fázi.

1.8. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.8.1. **Zkušební podmínky**

Teplota během měření se zaznamenává. Pro zajištění konstantních podmínek během kalibrace a předběžných měření a během měření zkoušené látky se velmi doporučuje použití kolony s regulací teploty.

1.8.2. **Stanovení mrtvého času t0**

Pro stanovení mrtvého času lze použít dvě různé metody (viz také bod 1.2).

1.8.2.1. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí homologické řady*

Je ověřeno, že tato metoda poskytuje spolehlivé a standardizované hodnoty t_0. Podrobnosti viz zkušební metoda A.8 Rozdělovací koeficient (oktanol/voda) metodou HPLC.

1.8.2.2. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí inertních látek, které nejsou v koloně zadržovány*

Tato technika je založena na nástřiku roztoků formamidu, močoviny nebo dusičnanu sodného. Měření se provedou alespoň dvakrát.

1.8.3. **Stanovení retenčních časů tR**

Referenční látky se vyberou tak, jak je uvedeno v bodu 1.3. Pro stanovení jejich retenčních časů mohou být nastříknuty jako směsný standard, pokud je potvrzeno, že retenční čas žádného referenčního standardu není ovlivňován přítomností ostatních referenčních standardů. Kalibrace by měla být prováděna pravidelně, alespoň dvakrát denně, aby se objasnily neočekané změny účinnosti kolony. Nástřiky pro kalibraci by měly být prováděny přednostně před nástřikem zkoušené látky a po něm, aby se potvrdilo, že nedošlo ke změně retenčních časů. Zkoušené látky se nastříknou odděleně v co nejmenších množstvích (aby se kolona nepřetížila) a stanoví se jejich retenční časy.

▼B

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena alespoň dvě stanovení. Hodnoty log K_{ou} získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,25.

1.8.4. **Hodnocení**

Kapacitní faktory k' se vypočtou z mrtvého času t_0 a retenčních časů t_R vybraných referenčních látek podle rovnice 4 (viz bod 1.2). Hodnoty log k' referenčních látek se poté vynesou proti jejich hodnotám log K_{ou} z experimentů šaržovitou rovnovážnou metodou uvedeným v tabulkách 1 a 3 v dodatku. Z tohoto grafu se poté s použitím hodnoty log k' zkoušené látky určí její hodnota log K_{ou}. Je-li z vlastních výsledků zřejmé, že hodnota log K_{ou} leží mimo obor kalibrační křivky, zkouška se opakuje s vhodnějšími referenčními látkami.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpráva musí obsahovat tyto informace:

— identifikace zkoušené látky a referenčních látek, jejich čistota a podle potřeby hodnoty pK_a,

— popis zařízení a pracovních podmínek, např. typ a rozměry analytické kolony a předkolony, detekční zařízení, mobilní fáze (poměr složek a pH), rozmezí teploty během měření,

— mrtvý čas a použitá metoda jeho stanovení,

— množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,

— retenční časy referenčních sloučenin použitých ke kalibraci,

— charakteristiky proložené regresní křivky (log k' versus log K_{ou}) a graf regresní křivky,

— průměrné retenční údaje a odhad hodnoty log Kou zkoušené sloučeniny,

— chromatogramy.

3. LITERATURA

1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of *c*hemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227–231.

5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297–312.

▼B

6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831–832.

7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833–846.

8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35-(1/2), 121–128.

9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341–2352.

11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285–304.

12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384.

▼B

DODATEK

Tabulka 1

Srovnání hodnot K_{ou} pro půdy a čistírenské kaly a hodnot vypočtených screeningovou metodou s HPLC ([1]), ([2])

Látka	Číslo CAS	log K_{ou} pro čistírenské kaly	log K_{ou} pomocí HPLC		log K_{ou} pro půdy	log K_{ou} pomocí HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenylbenzoát	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107–119.

Tabulka 2

Výsledky mezilaboratorního srovnávacího testu provedeného za účelem zlepšení a validace metody HPLC (11 zúčastněných laboratoří) ([1])

Látka	Číslo CAS	log K_{ou}	K_{ou}	log K_{ou}
		(OECD 106)	HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373—1384.

▼B

Tabulka 3

Referenční látky doporučené pro screeningovou metodu s HPLC na základě adsorpčních údajů pro půdu

Referenční látka	Číslo CAS	Logaritmy středních hodnot K_{ou} z šaržovité rovnovážné metody	Počet hodnot K_{ou}	Logaritmus směrodatné odchylky	Zdroj
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N,N-Dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Methyl-benzoát	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Methiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH (lindan)	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
alfa-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (směs)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285–304
(c) Údaje poskytnuté průmyslem.

▼B

C.20. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI U *DAPHNIA MAGNA*

1. METODA

Tato zkouška toxicity pro reprodukci je replikou metody OECD TG 211 (1998).

1.1. ÚVOD

Hlavním cílem zkoušky je posoudit účinky chemických látek na reprodukční schopnost druhu *Daphnia magna*.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Rodičovské organismy: dafnie samičího pohlaví, které jsou přítomné na začátku zkoušky a jejich reprodukční schopnost je předmětem studie.

Potomstvo: mladé dafnie pocházející z rodičovských organismů v průběhu zkoušky.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (lowest observed effect concentration, LOEC): nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na reprodukci a na mortalitu rodičovských organismů (na hladině významnosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (no observed effect concentration NOEC): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolní skupinou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

$\mathbf{EC_x}$: koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve vodě, která pro danou expoziční dobu vede k x % snížení reprodukce dafnií *Daphnia magna*.

Vnitřní míra růstu populace: míra růstu populace, v níž je zahrnuta reprodukční schopnost a mortalita specifická z hlediska stáří (20, 21, 22). V ustáleném stavu bude nulový. Pro rostoucí populaci bude kladný a pro snižující se populaci bude záporný. Je zřejmé, že při záporném růstu nelze druh zachovat a nakonec dojde k jeho vyhynutí.

Mez detekovatelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku detekovat, nikoli však stanovit.

Mez stanovitelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku kvantitativně naměřit.

Mortalita: organismus se zaznamená jako mrtvý, je-li nepohyblivý, tj. není-li schopen plavat nebo není-li u končetin nebo zadečku pozorován pohyb do 15 sekund po lehkém zatřepání zkušební nádobou. (Použije-li se jiná definice, musí být uvedena společně s odkazem na literaturu.)

▼B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé samičí dafnie (rodičovské organismy) na začátku zkoušky mladší než 24 hodin se exponují zkoušené látce přidané do vody v určitém rozsahu koncentrací. Zkouška trvá 21 dní. Na konci zkoušky se odhadne celkový počet vylíhnutých živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky. To znamená, že nedospělé dafnie pocházející z dospělých dafnií, které v průběhu zkoušky uhynuly, se z odhadů vyloučí. Reprodukční schopnost rodičovských organismů lze vyjádřit jiným způsobem (např. jako počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu za den, a to od prvního dne, kdy bylo potomstvo pozorováno), který se však uvede doplňkově vedle celkového počtu nedospělých dafnií pocházejících z jedné rodičovské dafnie živé na konci zkoušky. Reprodukční schopnost organismů exponovaných zkoušené látce se porovná s reprodukční schopností kontrolní skupiny (kontrolních skupin) s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC). Kromě toho se údaje pokud možno analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % snížení reprodukční schopnosti, (tj. EC_{50}, EC_{20} nebo EC_{10}).

Musí být rovněž uvedeno přežití rodičovských organismů a okamžik vylíhnutí prvních potomků. Zkoumány mohou být také jiné účinky vyvolané látkou, které mají vliv na charakteristiky, jako jsou růst (např. vliv na délku) a popřípadě vnitřní míra růstu populace

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být k dispozici výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.2, část I) provedené u *Daphnia magna*. Výsledky mohou být užitečné pro volbu vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkouškách toxicity pro reprodukci. Měly by být známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženým výtěžkem a mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, stálost v podmínkách zkoušky pKa, $P_{o/v}$ a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolní skupiny (kontrolních skupin) splněna tato kriteria reprodukční schopnosti:

— mortalita rodičovských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20 %,

— střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu živého na konci zkoušky je ≥ 60.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Přístroje a pomůcky**

Zkušební nádoby nebo jiné přístroje a pomůcky, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být skleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami jsou obvykle skleněné kádinky.

Kromě toho bude nezbytné některé nebo veškeré toto zařízení:

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným vybavením na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),

▼B

— vhodný přístroj pro regulaci teploty,

— pH-metr,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody,

— zařízení pro stanovení celkového organického uhlíku (TOC) ve vodě nebo zařízení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (COD),

— vhodné zařízení pro ovládání režimu osvětlení a pro měření intenzity světla.

1.6.2. **Testovací organismy**

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna* Straus. Jiné druhy dafnií mohou být použity, pokud splňují příslušná kritéria validity (kritérium validity týkající se reprodukční schopnosti kontrolních skupin by mělo být relevantní pro daný druh dafnií). Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno.

Klon by měl být identifikován přednostně uvedením genotypu. Výzkum (1) ukázal, že reprodukční schopnost klonu A (který pochází z institutu IRCHA ve Francii) (3) stabilně splňuje kritérium validity, jímž je ≥ 60 potomků na přeživší rodičovský organismus při kultivaci za podmínek popsaných v této metodě. Jiné klony jsou však přijatelné, splňuje-li kultura dafnií prokazatelně kriteria validity pro tuto zkoušku.

Na začátku zkoušky musí být dafnie nejvýše 24 hodin staré a nesmí pocházet z první generace potomků. Musí pocházet ze zdravé kultury (tj. nesmí vykazovat známky stresu, např. zvýšenou mortalitu, přítomnost jedinců samčího pohlaví a efipií, zpoždění produkce prvních potomků, přítomnost jinak zbarvených jedinců atd.). Organismy z kmenové kultury musí být chovány v podmínkách podobných těm, které mají být použity při zkoušce (osvětlení, teplota, médium, krmení a počet dafnií na jednotku objemu). Liší-li se kultivační médium pro dafnie, které má být použito při zkoušce, od média používaného k rutinní kultivaci dafnií, doporučuje se zařadit před zkouškou obvykle třítýdenní aklimatizační období (tj. v délce odpovídající jedné generaci), aby nedošlo u rodičovských organismů ke stresu.

1.6.3. **Zkušební médium**

Doporučuje se, aby bylo v této zkoušce použito přesně definované médium. Tím se lze vyhnout použití přísad (např. mořských řas, extraktu z půdy atd.), které je obtížné charakterizovat, a zvýšit tak vyhlídky mezilaboratorní standardizace. Elendtova média M4 (4) a M7 byla shledána pro tento účel jako vyhovující. Jiná média (např. (5, 6)) jsou však přijatelná, splňuje-li reprodukční schopnost kultury dafnií prokazatelně kriteria validity pro tuto zkoušku.

Použije-li se médium, které obsahuje nestanovené přísady, měly by být tyto přísady jasně specifikovány a v protokolu o zkoušce se uvedou informace o složení, a to zejména o obsahu organického uhlíku, neboť může přispívat k dodávané potravě. Doporučuje se, aby byl stanoven celkový organický uhlík (TOC) a/nebo chemická spotřeba kyslíku (COD) výchozího preparátu organické přísady a aby byl odhadnut výsledný příspěvek k TOC nebo COD ve zkušebním médiu. Doporučuje se, aby byly úrovně TOC v médiu (tj. před přidáním řas) nižší než 2 mg/l (7).

▼B

Při zkoušení látek obsahujících kovy je důležité si uvědomit, že vlastnosti zkušebního média (např. tvrdost, chelatační schopnosti) mohou mít vliv na toxicitu látky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby bylo médium přesně definováno. V současnosti jsou však jedinými přesně definovanými médii, o nichž je známo, že jsou vhodná pro dlouhodobou kultivaci kultury druhu *Daphnia magna*, Elendtova média M4 a M7. Obě média obsahují chelatační činidlo EDTA. Práce (2) ukázaly, že provádí-li se zkouška v médiích M4 a M7, je „zdánlivá toxicita“ kadmia zpravidla nižší než v médiu, které neobsahuje EDTA. Média M4 a M7 se tedy nedoporučují pro zkoušení látek obsahujících kovy a neměla by se používat ani jiná média obsahující činidla známá svou chelatační schopností. V případě látek obsahujících kovy se doporučuje používat jiné médium, například rekonstituovanou tvrdou sladkou vodu podle ASTM (7), která neobsahuje EDTA a do níž je přidán extrakt z řas (8). Tato kombinace rekonstituované tvrdé sladké vody podle ASTM a extraktu z řas je také vhodná pro dlouhodobou kultivaci druhu *Daphnia magna* (2) a pro zkoušení na tomto druhu, přestože stále vykazuje slabé chelatační účinky způsobené organickými složkami přidaného extraktu z řas.

Na začátku zkoušky a v jejím průběhu by měla být koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 3 mg/l. pH by mělo být v rozmezí 6 až 9 a zpravidla by se nemělo v žádné zkoušce měnit o více než 1,5. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako $CaCO_3$). Ve zkouškách při této a vyšší tvrdosti reprodukční schopnost prokazatelně vyhovovala kritériím validity (9, 10).

1.6.4. **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se obvykle připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky se připraví nejlépe rozpuštěním látky ve zkušebním médiu.

Pro přípravu vhodně koncentrovaného zásobního roztoku může být někdy nezbytné použití organických rozpouštědel nebo dispergátorů, měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. V žádném případě by však neměl obsah zkoušené látky ve zkušebních roztocích vést k překročení její rozpustnosti ve zkušebním médiu.

K přípravě zásobního roztoku, který lze přesně dávkovat do vody, se použijí rozpouštědla. Při doporučené koncentraci rozpouštědla v konečném zkušebním médiu (tj. ≤ 0,1 ml/l) nejsou výše uvedená rozpouštědla toxická a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

Dispersanty mohou usnadnit přesné dávkování a dispergaci. Při doporučené koncentraci v konečném zkušebním médiu (≤ 0,1 ml/l) nejsou výše uvedené dispergátory toxické a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

▼B

1.7. USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Expozice se rozvrhne pro jednotlivé zkušební nádoby a veškerá další manipulace se zkušebními nádobami se provádějí náhodně. Nedodržení této zásady může vést k jednostrannému vychýlení, které může být považováno za účinek koncentrace. Je-li například s experimentálními jednotkami manipulováno v pořadí varianty nebo v pořadí koncentrací, mohl nějaký časově podmíněný efekt, např. únava obsluhy nebo jiné pochybení, vést k vyšším účinkům při vyšších koncentracích. Mohou-li být výsledky ovlivněny počátečními podmínkami zkoušky nebo okolními podmínkami, jako je např. umístění v laboratoři, mělo by být dále zváženo blokové uspořádání zkoušky.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmínky expozice**

1.8.1.1. *Délka expozice*

Zkouška trvá 21 dní.

1.8.1.2. *Nasazování*

Rodičovské organismy se umístí po jednom do zkušebních nádob s 50 až 100 ml média.

V některých případech může být nezbytné použít větší objemy, aby bylo možné splnit požadavky analytické metody použité pro stanovení koncentrace zkoušené látky, třebaže je sdružování paralelních vzorků k chemické analýze rovněž přípustné. Jsou-li použity objemy větší než 100 ml, může být nezbytné zvýšit dávky podávané dafniím, aby se zajistila odpovídající dostupnost potravy a splnila kritéria validity. U průtokových zkoušek mohou být z technických důvodů zvážena jiná uspořádání (např. čtyři skupiny po 10 organismech ve větším zkušebním objemu), avšak jakékoli změny uspořádání zkoušky musí být uvedeny.

1.8.1.3. *Počet organismů*

U semistatických zkoušek se nasadí jednotlivě alespoň 10 organismů pro každou zkušební koncentraci a alespoň 10 organismů jednotlivě do kontrolních skupin.

U průtokových zkoušek se ukázalo vhodným rozdělit pro každou koncentraci 40 organismů do čtyř skupin po 10 organismech (1). Může být použit menší počet testovacích organismů, přičemž se doporučuje na jednu koncentraci rozdělit minimálně 20 organismů do dvou nebo více paralelních skupin o stejném počtu organismů (např. čtyři paralelní skupiny po pěti dafniích). Je třeba poznamenat, že u zkoušek, při nichž se organismy nasazují jako skupiny, nebude možné vyjádřit reprodukční schopnost jako počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky, v případě, že rodičovský organismus uhyne. V takovém případě se reprodukční schopnost vyjádří jako „celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu přítomného na začátku zkoušky“.

1.8.1.4. *Krmení*

U semistatických zkoušek se dafnie krmí přednostně denně, nejméně však třikrát týdně (tj. s výměnou média). Odchylky od této praxe (např. u průtokových zkoušek) se uvedou v protokolu.

▼B

Potrava rodičovských organismů během zkoušky by měla sestávat přednostně z živých jednobuněčných řas jednoho nebo více těchto druhů: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (nyní *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) a *Scenedesmus subspicatus*. Dodávaná potrava by měla vycházet z množství organického uhlíku (C) dodávaného na jeden rodičovský organismus. Výzkum (12) ukázal, že u druhu *Daphnia magna* je množství potravy obsahující od 0,1 do 0,2 mg C na dafnii za den dostatečné na to, aby bylo dosaženo požadovaného potomstva nezbytného pro splnění kritérií validity. Potrava může být dodávána buď ve stejných dávkách po celou dobu zkoušky, nebo podle požadavku v nižších dávkách na začátku zkoušky a poté ve zvyšujících se dávkách s ohledem na růst rodičovských organismů. V takovém případě by mělo množství potravy po celou dobu obsahovat doporučené množství 0,1 až 0,2 mg C na dafnii za den.

Použije-li se k určení požadovaného množství potravy zástupný ukazatel, jako je počet jednobuněčných řas nebo absorbance ve viditelném světle (z praktických důvodů, neboť měření obsahu uhlíku je časově náročné), musí každá laboratoř vytvořit vlastní nomogram vztahu zástupného ukazatele a obsahu uhlíku v kultuře řas (viz dodatek 2 s návodem na vytvoření nomogramu). Nomogramy by měly být ověřovány jednou ročně a častěji v případě, že se změní podmínky kultivace řas. Absorbance ve viditelném světle byla shledána lepším zástupným ukazatelem celkového obsahu uhlíku než počet buněk (13).

Dafniím by měla být dodávána koncentrovaná suspense řas, aby se minimalizoval objem kultivačního média řas uváděný do zkušební nádoby. Zkoncentrování řas lze dosáhnout centrifugací a následnou resuspensí v destilované vodě, v deionizované vodě nebo v kultivačním médiu dafnií.

1.8.1.5. *Osvětlení*

16 hodin světla při intenzitě nepřekračující 15 až 20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Teplota*

Teplota testovacího média by měla být v rozmezí 18–22 °C. V žádné zkoušce by však teplota neměla v těchto mezích kolísat o více než 2 °C (např. 18 až 20, 19 až 21 nebo 20 až 22 °C). Pro účely sledování teploty může být vhodné použít další zkušební nádobu.

1.8.1.7. *Provzdušňování*

Zkušební nádoby nesmí být během zkoušky provzdušňovány.

1.8.2. **Zkušební koncentrace**

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2 a přiměřený počet paralelních zkušebních skupin v rámci každé zkušební koncentrace (viz bod 1.8.1.3). Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Látky by neměly být zkoušeny při koncentracích vyšších, než je jejich rozpustnost ve zkušebním médiu.

▼B

Při volbě rozsahu koncentrací měly být zohledněny tyto zásady:

i) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejnižší zkušební koncentrace dostatečně nízká, aby nebyla plodnost při této koncentraci významně nižší, než je plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se sníženou nejnižší koncentrací;

ii) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejvyšší zkušební koncentrace dostatečně vysoká, aby byla plodnost při této koncentraci významně nižší, než je plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se zvýšenou nejvyšší koncentrací;

iii) má-li být pro účinky na reprodukci odhadnuta EC_X, doporučuje se, aby byl použit dostatečný počet koncentrací s cílem zjistit EC_X s přijatelným intervalem spolehlivosti. Je-li znám odhad EC_{50} pro účinky pro reprodukci, doporučuje se, aby byla nejvyšší zkušební koncentrace vyšší než tato EC_{50}. Jinak sice bude stále možné odhadnout EC_{50}, interval spolehlivosti však bude velmi široký a nemusí být možné uspokojivé posouzení přiměřenosti navrženého modelu;

iv) do rozsahu zkušebních koncentrací by pokud možno neměly spadat koncentrace, které mají statisticky významný účinek na přežití dospělců, neboť by mohl být změněn charakter zkoušky z pouhé zkoušky toxicity pro reprodukci na kombinovanou zkoušku toxicity pro reprodukci a mortality, která vyžaduje daleko složitější statistickou analýzu.

Předchozí znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku rozpouštědlo nebo dispergátor (viz bod 1.6.4), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádobě vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádobách stejná.

1.8.3. **Kontrolní skupiny**

Kromě zkušební série se nasadí jedna série kontrolních skupin pro kontrolu zkušebního média a podle potřeby jedna série kontrolních skupin obsahujících rozpouštědlo nebo dispergátor. Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být jejich koncentrace stejná jako koncentrace v nádobách se zkoušenou látkou. Použije se vhodný počet paralelních skupin (viz oddíl 1.8.1.3).

V dobře vedených zkouškách by měl být variační koeficient středního počtu živých potomků připadajících na rodičovský organismus v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zpravidla ≤ 25 %, a měl být uveden v návrzích zkoušek s oddělenými jedinci.

1.8.4. **Obnovování zkušebního média**

Četnost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, médium se však obnovuje alespoň třikrát týdně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky po maximální dobu mezi obnoveními média (tj. po tři dny) stálá (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), mělo by být zváženo častější obnovování média nebo průtoková zkouška.

▼B

Při obnovování média v semistatických zkouškách se připraví druhá série zkušebních nádob a rodičovské organismy se do nich přenesou např. skleněnou pipetou o vhodném průměru. Objem média přeneseného s dafniemi by měl být co nejmenší.

1.8.5. **Pozorování**

Výsledky pozorování prováděných během zkoušky se zaznamenávají do přehledu údajů (viz příklady v dodatcích 3 a 4). Jsou-li požadována další měření (viz body 1.3 a 1.8.8), může být nezbytné provádět další pozorování.

1.8.6. **Potomstvo**

Potomstvo pocházející z každého rodičovského organismu se od jeho prvního výskytu nejlépe denně vybírá a počítá, aby nespotřebovávalo potravu určenou pro dospělého jedince. Pro účely této metody je třeba počítat pouze živé potomstvo, avšak přítomnost nevylíhnutých vajíček nebo mrtvého potomstva se zaznamená.

1.8.7. **Mortalita**

Mortalita rodičovských organismů se zaznamenává přednostně denně, a měla by být stanovována alespoň při počítání potomstva.

1.8.8. **Další parametry**

Třebaže je tato metoda navržena hlavně k posouzení účinků na reprodukci, mohou však být i jiné účinky kvantifikovány v míře dostatečné pro statistickou analýzu. Zvláště měření růstu jsou žádoucí, neboť poskytují informaci o možných subletálních účincích, které mohou být užitečnější než samotná měření reprodukce; doporučuje se na konci zkoušky změřit délku rodičovských organismů (tj. délku těla bez zadečkového hrotu). Mezi další parametry, které lze měřit nebo vypočítávat, patří doba do vylíhnutí prvních plůdků (a následně dalších potomků), počet a velikost potomků na jeden organismus, počet nevylíhnutých plůdků, přítomnost jedinců samčího pohlaví nebo efipií a vnitřní míra růstu populace.

1.8.9. **Četnost analytických stanovení a měření**

Koncentrace kyslíku, teplota, tvrdost a pH se měří alespoň jednou týdně před obnovením média a po něm, v kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ±20 % nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 % – viz body 1.4 a 1.4.8), se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a při obnovování, a to jednou během prvního týdne zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – při jeho přípravě a při obnovování). Tato stanovení se poté opakují alespoň v týdenních intervalech.

▼B

U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to ihned po jejich přípravě a při obnovování. U zkoušek, u nichž není naměřená počáteční koncentrace zkoušené látky v rozsahu ± 20 % nominální koncentrace, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), by mohla být stanovení ve 2. a 3. týdnu zkoušky omezena na nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace. Ve všech případech je stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádoby.

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Doporučuje se však zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé.V těchto typech zkoušky se průtok ředicí vody a zkoušené látky kontroluje denně.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, vyjádří se výsledky jako časově vážené průměry (viz dodatek 5).

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené látky na celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky. Celkový počet potomků na rodičovský organismus se vypočte pro každou zkušební nádobu (tj. pro každou paralelní nádobu). Jestliže v kterékoli paralelní nádobě rodičovský organismus během zkoušky uhyne nebo se zjistí, že jde o samečka, vyloučí se nádoba z experimentu. Analýza se poté provede se zmenšeným počtem paralelních nádob.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC vztahujících se k účinkům chemické látky na reprodukční schopnosti je nezbytné vypočítat střední hodnotu reprodukční schopnosti pro všechny paralelní nádoby pro každou koncentraci a celkový residuální rozptyl, a to lze provést analýzou rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (14, 15, 16, 17). Je nezbytné ověřit, že je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Doporučuje se provést ověření raději graficky než formálním testem významnosti (18); vhodnou alternativou je Bartlettův test. Není-li tento předpoklad splněn, měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylu, nebo by měla být provedena vážená ANOVA. Vypočte se a uvede se velikost účinku zjistitelná pomocí ANOVA (tj. nejmenší významný rozdíl).

▼B

Pro odhad koncentrace, která způsobuje 50 % snížení reprodukční schopnosti (tj. EC_{50}), se údaji proloží vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logistická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka by měla být parametrizována tak, aby bylo možné přímo odhadnout EC_{50} a její směrodatnou odchylku. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnotu EC_{50}. Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uvede se oboustranný 95 % interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. To lze provést graficky nebo rozdělením reziduálního součtu čtverců na složku „chyby v proložení“ a „náhodné chyby“ a provedením testu významnosti chyby v proložení. Vzhledem k tomu, že u expozic, jejichž důsledkem je vyšší reprodukční schopnost, je větší rozptyl počtu vylíhnutých potomků než u expozic vedoucích k nejnižší reprodukční schopnosti, je třeba promyslet vážení pozorovaných hodnot s cílem zohlednit různé rozptyly u různě exponovaných skupin (18).

Při analýze údajů z rozhodujícího okružního testu (2) byl použit tento model prokládající logistickou křivku; lze však použít i jiné modely:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

kde:

Y = celkový počet živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky (vypočteno pro každou nádobu);

x = koncentrace látky;

c = očekávaný počet potomků při x = 0;

x_0 = EC_{50} v populaci;

b = směrnice.

Tento model bude pravděpodobně vhodný pro velký počet situací, budou však existovat zkoušky, pro něž bude nevhodný. Jak bylo výše doporučeno, je třeba ověřit validitu modelu. V některých případech může být vhodnější model předpokládající hormesi, u něhož vedou nižší koncentrace k vyšším účinkům (19).

Lze rovněž odhadnout další koncentrace s určitým účinkem, např. EC_{10} nebo EC_{20},může být však třeba použít jinou parametrizaci modelu, než je použita pro odhad EC_{50}.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace

2.2.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální povaha a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼B

— údaje o chemické identifikaci včetně údaje o čistotě.

2.2.2. **Testovací druhy:**

— klon (byl-li geneticky popsán), dodavatel nebo zdroj (je-li znám) a použité kultivační podmínky. Byl-li použit jiný druh než *Daphnia magna*, musí to být uvedeno a zdůvodněno.

2.2.3. **Zkušební podmínky:**

— použitý zkušební postup (např. semistatická nebo průtoková metoda, objem, velikost obsádky v počtu dafnií na litr),

— fotoperioda a intenzita světla,

— uspořádání zkoušky (např. počet paralelních nádob, počet rodičovských organismů na jednu paralelní nádobu),

— podrobnosti o použitém kultivačním médiu,

— byly-li použity, přidané organické materiály včetně složení, zdroje, metody přípravy, TOC/COD výchozích preparátů, odhad výsledného TOC/COD ve zkušebním médiu,

— podrobné informace o krmení, zejména množství (v mg C na dafnii za den) a plán (např. typ krmiva, včetně specifického názvu (druhu) u řas a kmene, je-li znám, a kultivační podmínky),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (jsou-li použity, uvedou se rozpouštědlo nebo dispergátor a jejich koncentrace).

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,

— nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 4); uvede se také výtěžek metody a mez stanovitelnosti,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách (tj. pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a TOC a/nebo COD a dále podle potřeby tvrdost) (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— celkový počet živých potomků na každý rodičovský organismus (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— počet uhynulých rodičovských organismů a den, kdy k úhynu došlo (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— variační koeficient reprodukční schopnosti kontrolních skupin (založený na celkovém počtu živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky),

— křivka závislosti celkového počtu živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky (pro každou paralelní nádobu), na koncentraci zkoušené látky,

— nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na reprodukci včetně popisu použitých statistických metod a údaje o velikosti účinku, který mohl být detekován, a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) na reprodukci; je-li k dispozici, uvede se LOEC/NOEC pro mortalitu rodičovských organismů,

▼B

— je-li k dispozici, ECx pro reprodukci a interval spolehlivosti, dále graf křivky modelu použitého pro její výpočet, směrnice křivky závislosti dávka-reakce a její směrodatná odchylka,

— jiné pozorované biologické účinky a jiná měření: uvedou se jakékoli jiné biologické účinky, které byly pozorovány nebo změřeny (např. růst rodičovských organismů) včetně přiměřeného zdůvodnění,

— zdůvodnění jakékoli odchylky od této zkušební metody.

3. **LITERATURA**

1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20–21 March 1993.

2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, 257–265.

4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775–782.

7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 str.

8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) str. 144–148.

9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1–8.

10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185–196.

11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053–2058.

▼B

13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459–466.

14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510–531.

18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93–96.

20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, str. 532.

22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼B

DODATEK 1

PŘÍPRAVA PŘESNĚ DEFINOVANÝCH ELENDTOVÝCH MÉDIÍ M7 A M4

Aklimatizace na Elendtova media M4 a M7

Některé laboratoře narazily na obtíže při přímém přenosu dafnií do médií M4 (1) a M7. Určitého úspěchu však bylo dosaženo postupnou aklimatizací, tj. s přenesením z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Délky doby aklimatizace mohou být nepochybně jeden měsíc.

PŘÍPRAVA

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reversní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody mg/l	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) násobek	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000	—	—

Jak roztok Na_2EDTA, tak roztok $FeSO_4$ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávují. Získají se:

2 litry roztoku Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody mg/l	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) násobek	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média ml/l	
			M4	M7
Zásobní roztok II obsahující kombinaci stopových prvků		20	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:				
Thiaminhydrochlorid	750	10 000	—	—
Kyanokobalamin (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých alikvotních dílech. Vitaminy se do média přidávají krátce před použitím.

Poznámky: Aby nedošlo při přípravě kompletního média k vysrážení solí, přidají se podíly zásobních roztoků do asi 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámky: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultra-structural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. *Protoplasma*, 154, 25–33.

▼B

DODATEK 2

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (TOC) A VYTVOŘENÍ NOMOGRAMU PRO OBSAH TOC v KRMIVU NA BÁZI ŘAS

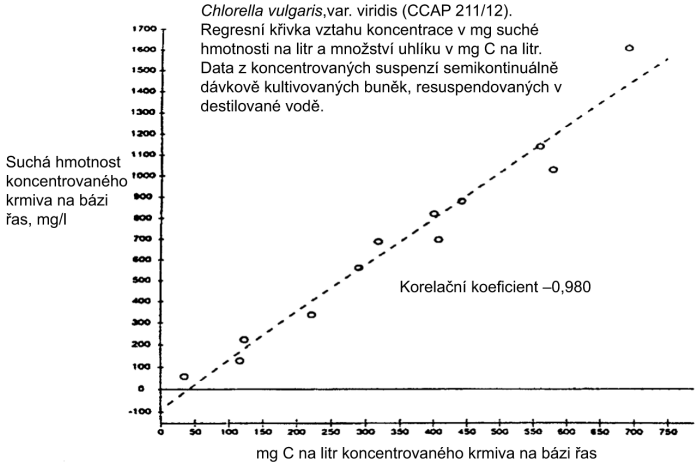
Je známo, že obsah uhlíku v krmivu na bázi řas se obvykle neměří přímo, ale stanoví se z korelací (tj. z nomogramů) se zástupnými ukazateli, jako jsou počet buněk řas nebo absorbance ve viditelném světle.

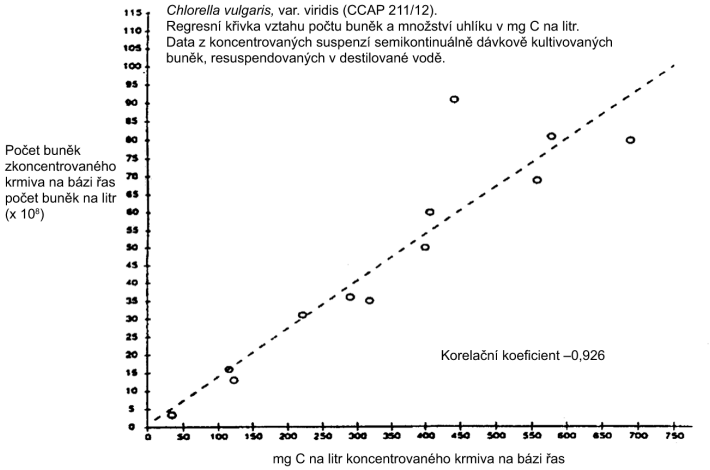
TOC by měl být stanoven spíše vysokoteplotní oxidací než pomocí UV nebo persíranovou metodou. (Viz: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.)

Pro účely vytvoření nomogramu se řasy oddělí od růstového média centrifugací a poté se resuspendují v destilované vodě. Zástupný ukazatel a koncentrace TOC se měří v každém vzorku třikrát. Provede se analýza slepého pokusu s destilovanou vodou a jeho koncentrace TOC se odečte od koncentrace TOC ve vzorku s řasami.

Nomogram by měl být lineární v požadovaném rozsahu koncentrací uhlíku. Příklady jsou uvedeny níže.

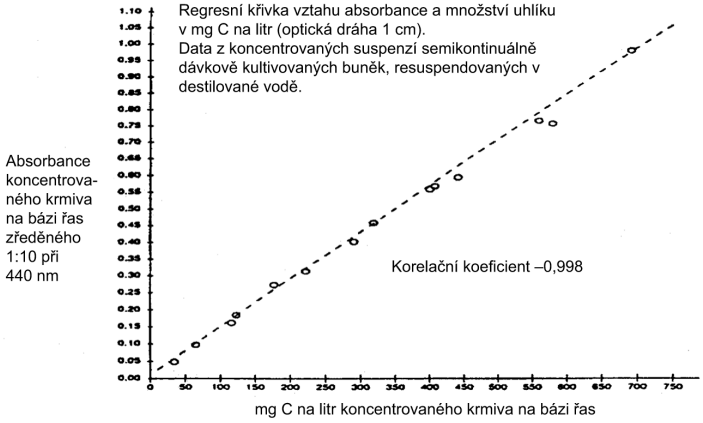
Poznámka: Tyto příklady nelze pro účely přepočtu použít; je důležité, aby si laboratoře připravily vlastní nomogramy.





▼B

Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regresní křivka vztahu absorbance a množství uhlíku v mg C na litr (optická dráha 1 cm).
Data z koncentrovaných suspenzí semikontinuálně dávkově kultivovaných buněk, resuspendovaných v destilované vodě.



▼B

DODATEK 3

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ OBNOVY MÉDIA, SLEDOVANÝCH FYZIKÁLNĚCHEMICKÝCH ÚDAJŮ, KRMENÍ, REPRODUKČNÍ SCHOPNOSTI DAFNIÍ A MORTALITY DOSPĚLCŮ

Experiment č.:	Datum zahájení:				Klon:				Médium:				Typ krmiva:				Zkoušená látka				Nominální koncentrace:			
Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Obnovení média (zaškrtněte)																								
pH (1)																							nové	
																							staré	
O_2 mg/l (1)																							nové	
																							staré	
Teplota (°C) (1)																							nové	
																							staré	
Podání krmiva (zaškrtněte)																								
Počet živých potomků (2)																								Celkem
Nádoba 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Experiment č.:	Datum zahájení:	Klon:	Médium:	Typ krmiva:	Zkoušená látka	Nominální koncentrace:

Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Celkem	
Kumulativní mortalita dospělců ([3])																								

([1]) Uvede se, ve které nádobě bylo měření provedeno.
([2]) Do příslušné buňky se zaznamenají nevylíhnuté plůdky jako „AB“ (*aborted broods*).
([3]) Do příslušné buňky se zaznamená mortalita dospělců jako „M“

▼B

DODATEK 4

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ VÝSLEDKŮ CHEMICKÉ ANALÝZY

a) **Naměřené koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

b) **Naměřené koncentrace vyjádřené v procentech nominální koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

▼B

DODATEK 5

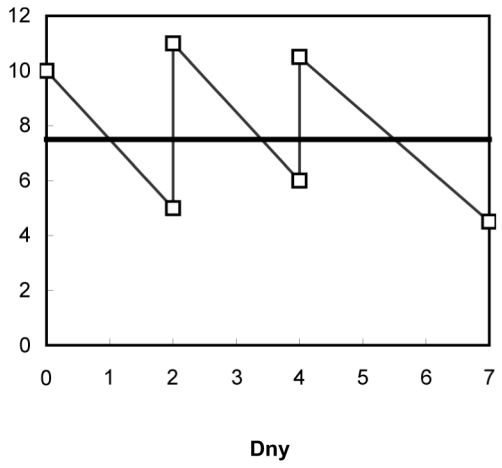
VÝPOČET ČASOVĚ VÁŽENÉ STŘEDNÍ HODNOTY

Časově vážená střední hodnota

Vzhledem k tomu, že mezi výměnami média může koncentrace zkoušené látky klesat, je nezbytné zvážit, jaká koncentrace bude považována za reprezentativní pro rozsah koncentrací, jimž byly dospělé dafnie vystaveny. Výběr by měl být založen na biologických i statistických úvahách. Vychází-li se například z toho, že reprodukce je ovlivňována hlavně maximální koncentrací, jíž byl organismus vystaven, měla by být použita maximální koncentrace Považuje-li se však za významnější akumulované nebo dlouhodobé působení toxické látky, má větší opodstatnění průměrná koncentrace. v takovém případě je vhodným průměrem časově vážená střední koncentrace, neboť zohledňuje časové změny okamžité koncentrace.

Obrázek 1:

Příklad časově vážené střední hodnoty



Na obrázku 1 je znázorněn příklad (zjednodušené) zkoušky trvající sedm dní s obnovou média v den 0, 2 a 4.

Tenká klikatá čára znázorňuje koncentraci v kterémkoli okamžiku. Má se za to, že pokles koncentrace sleduje proces exponenciálního rozkladu buněk.

Šest vyznačených bodů představuje koncentrace naměřené na začátku a na konci období mezi obnoveními média.

Silná plná čára vyznačuje hodnotu časově vážené střední hodnoty.

Časově vážená střední hodnota je vypočtena tak, aby se plocha pod čarou pro časově váženou střední hodnotu rovnala ploše pod čarou průběhu koncentrace. Výpočet pro výše uvedený příklad je ilustrován v tabulce 1.

▼B

Tabulka 1

Výpočet časově vážené střední hodnoty

Obnovení média č.	Dny	Konc0	Konc1	Ln(Konc0)	Ln(Konc1)	Plocha
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Celkový počet dnů: 7					Celková plocha	50,091
					ČV střední hodnota	7,156

Dny se rozumí počet dnů mezi obnoveními média.

Konc0 je naměřená koncentrace na začátku období mezi obnoveními média.

Konc1 je naměřená koncentrace na konci období mezi obnoveními média.

Ln(Konc0) je přirozený logaritmus Konc0.

Ln(Konc1) je přirozený logaritmus Konc1.

Plocha je plocha pod exponenciální křivkou pro každé období mezi obnoveními média. Vypočte se z rovnice:

$$Area = \frac{Konc_0 - Konc_1}{Ln(Konc_0) - Ln(Konc_1)} \times Days$$

Časově vážená střední hodnota (ČV *střední hodnota*) se vypočte jako podíl *celkové plochy* a *celkového počtu dnů*.

Pro zkoušku toxicity pro reprodukci na dafniích se tabulka pochopitelně rozšíří tak, aby pokrývala 21 dnů.

Je zřejmé, že provádí-li se měření pouze na začátku a na konci období mezi obnoveními média, není možné potvrdit, že je proces rozkladu skutečně exponenciální. Jiná křivka by vedla k jinému způsobu výpočtu „plochy“. Exponenciální rozklad však není nepřijatelný a jemu odpovídající křivka je pravděpodobně nejideálnější, chybí-li jiné informace.

Je však nezbytné postupovat opatrně, není-li v médiu na konci období mezi jeho obnoveními zjištěno žádné množství zkoušené látky. Není-li možné odhadnout, jak rychle látka z roztoku zmizela, není možné získat realistickou plochu pod křivkou, a není tedy možné získat rozumnou časově váženou střední hodnotu.

▼B

C.21. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU

1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování dlouhodobých účinků chemických látek po jednorázové expozici na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci dusíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto i k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3), společnosti SETAC (4) a Mezinárodní organizace pro normalizaci (5). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoha na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (6). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků vychází ze směrnice ISO (7) a z doporučení semináře v Belgirate. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci dusíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci dusíku, tak zkouška na transformaci uhlíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace dusíku v aerobních povrchových půdách. Tato metoda rovněž umožňuje odhadnout účinky látek na transformaci uhlíku půdní mikroflórou. K tvorbě dusičnanů dochází po rozpadu vazeb uhlík-dusík. Pokud je tedy u zkušebních a kontrolních půd zjištěna stejná rychlost tvorby dusičnanů, je vysoce pravděpodobné, že hlavní schéma odbourávání uhlíku je neporušené a funkční. Substrát zvolený pro zkoušku (prášková vojtěšková moučka) má příznivý poměr uhlíku a dusíku (obvykle od 12/1 do 16/1). Je tedy snížen nedostatek uhlíku v průběhu zkoušky, a dojde-li k poškození populace mikroorganismů chemickou látkou, může k jejich obnově dojít opět do 100 dnů.

▼B

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Použití zkoušky však není omezeno pouze na agrochemikálie. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se tedy stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci dusíku. Data z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x, kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace dusíku: konečný rozklad dusíkaté organické látky mikroorganismy cestou amonifikace a nitrifikace na příslušný konečný anorganický produkt – dusičnan.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x-procentní inhibici transformace dusíku na dusičnan.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace dusíku na dusičnan.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou uvedenay.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Do proseté půdy se vpraví prášková rostlinná moučka a na půdu se poté aplikuje zkoušená látka, nebo se půda ponechá nedotčená (jako kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentrací na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy vyluhují vhodným rozpouštědlem a stanoví se obsah dusičnanů. Rychlost tvorby dusičnanů v exponovaných vzorcích se porovnává s rychlostí v kontrolních vzorcích a vypočte se procentuální odchylka hodnot experimentálních vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou 25 % nebo větší, v měření se pokračuje až do 100 dnů. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a množství vzniklých dusičnanů v experimentálních a kontrolních vzorcích se měří po 28denní inkubaci. Výsledky zkoušek s více koncentracemi se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi koncentracemi dusičnanů v kontrolní a exponovaných vzorcích, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, ktery bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Použije se standardní laboratorní vybavení, které zahrnuje:

— třepačku: mechanickou třepačku nebo rovnocenné vybavení,

— odstředivku (3 000 g) nebo filtrační zařízení (za použití filtračního papíru bez dusičnanů),

— měřicí zařízení pro stanovení dusičnanů s vhodnou citlivostí a reprodukovatelností.

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

— obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,

— stanoví se mikrobiální biomasa (8, 9) a její uhlík by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. V důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabité půdy.

▼B

1.6.3. **Odběr a skladování vzorků půd**

1.6.3.1. *Odběr*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm).

Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. *Skladování*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při –18 °C až –22 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

1.6.4. **Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**

1.6.4.1. *Předběžná inkubace*

Pokud byla půda skladována (viz oddíl 1.6.3.2), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.4.3. *Obohacení organickým substrátem*

Půda by měla být obohacena vhodným organickým substrátem, např. zelenou travní moučkou s vojtěškou (hlavní složka: *Medicago sativa) s* poměrem C/N od 12/1 do 16/1. Doporučená dávka vojtěškové moučky je 5 g vojtěšky na kilogram půdy (vztaženo na sušinu).

1.6.5. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba pokud možno zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. **Zkušební koncentrace**

Při zkoušení agrochemikálií se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predicted Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky. U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovované hodnoty EC_x values.

▼B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovnávají rychlosti tvorby dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích a vypočítají se hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odběry vzorků a analýzy půd**

1.7.2.1. *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se obsah dusičnanů ve vzorcích analyzuje v 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah dusičnanů se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jeho konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. v 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky. Podle potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít ve zprávě jako výchozí koncentraci dusičnanů v půdě.

1.7.2.2. *Analýza vzorků půd*

Pro každý čas odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví obsah dusičnanů. Dusičnany se extrahují ze vzorků třepáním s vhodným extrakčním roztokem, např. s 0,1 M roztokem chloridu draselného. Doporučuje se použít 5 ml roztoku KCl na gram sušiny půdy. Při optimální extrakci by měly být nádoby s půdou a extrakčním roztokem naplněny nejvýše z jedné poloviny. Směsi se extrahují třepáním při 150 ot./min. po dobu 60 minut. Směsi se odstředí nebo zfiltrují a kapalná fáze se analyzuje na dusičnany. Kapalný extrakt zbavený pevných částic lze před analýzou skladovat při 20 ± 5 °C) po dobu šesti měsíců.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství vytvořených dusičnanů v každém duplikátním vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Rychlost přeměny dusíku se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Množství vzniklých dusičnanů se vyjádří v mg dusičnanů na kg sušiny půdy za den. Rychlost tvorby dusičnanů se pro každou expozici porovná s rychlostí získanou pro kontrolní vzorky a vypočte se odchylka od kontrolních vzorků v procentech.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství dusičnanů v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Množství dusičnanů (tj. množství dusičnanů v mg na kg sušiny půdy) zjištěná v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. Z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x. Standardními metodami (10, 11, 12) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti ($p = 0,95$) pro vypočtené hodnoty EC_x.

Zkoušené látky s vysokým obsahem dusičnanů mohou přispívat k množství dusičnanu vytvořeného při zkoušce. Pokud se zkouší vysoké koncentrace těchto látek (např. chemikálie, u nichž se očekává opakované použití), musí být součástí zkoušky vhodné kontrolní vzorky (tj. půda a zkoušená látka bez rostlinné moučky). Data z těchto kontrol musí být zohledněna při výpočtech EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při jakémkoli odběru po 28 dnech rozdíl rychlosti tvorby dusičnanů při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti tvorby v kontrolách roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci dusíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

— zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),

— informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),

— způsob využití (např. zemědělská půda, les atd.),

— hloubka odběru vzorků (cm),

— obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),

— pH (ve vodě),

— obsah organického uhlíku (v % sušiny),

— obsah dusíku (v % sušiny),

— výchozí koncentrace dusičnanů (mg dusičnanů na kg sušiny),

— kapacita výměny kationů (mmol/kg),

— mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,

— odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,

— podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,

— případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Substrát:

— zdroj substrátu,

— složení (tj. vojtěšková moučka, zelená travní moučka s vojtěškou),

— obsah uhlíku, dusíku (v % sušiny),

— velikost síta (mm).

▼B

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,

— počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,

— podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,

— inkubační teplota,

— vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,

— použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),

— počet duplikátních vzorků,

— doby odběrů vzorků,

— metoda použitá pro extrakci dusičnanů z půdy.

Výsledky:

— postup analýzy a zařízení použité pro stanovení dusičnanů,

— jednotlivé naměřené hodnoty obsahu dusičnanů a jejich průměrné hodnoty ve formě tabulky,

— rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,

— podle potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— procentuální odchylka v rychlosti tvorby dusičnanů pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivost a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,

— statistické zpracování výsledků.

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

▼B

6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování možných dlouhodobých účinků jednorázové expozice přípravkům na ochranu rostlin a popřípadě jiným chemický látkam na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3) a společnosti SETAC (4). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoha na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (5). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků je založeno na směrnici ISO (6) a na doporučeních ze semináře v Belgirate.

Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci uhlíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci uhlíku, tak zkouška na transformaci dusíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

▼B

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace uhlíku v aerobních povrchových půdách. Zkouška je citlivá na změny ve velikosti a aktivitě mikrobiální populace, která je odpovědná za transformaci uhlíku, neboť tyto populace budou vystaveny jak chemickému stresu, tak nedostatku uhlíku. Použijí se písčité půdy s nízkým obsahem organického materiálu. Tyto půdy se exponují zkoušené látce a inkubují za podmínek, které umožňují rychlý mikrobiální metabolismus. Za těchto podmínek se zdroje snadno dostupného uhlíku rychle vyčerpají. To způsobí nedostatek uhlíku, který vede nejen k odumření mikrobiálních buněk, ale také indukuje klidové stadium a/nebo tvorbu sporů. Pokud se zkouška provádí déle než 28 dnů, lze souhrn těchto reakcí měřit v kontrolních vzorcích (neexponovaná půda) jako postupnou ztrátu metabolicky aktivní mikrobiální biomasy (7). Pokud je biomasa v půdě s nedostatkem uhlíku za podmínek zkoušky ovlivněna přítomností chemické látky, pravděpodobně se nevrátí do téhož stavu jako kontrolní vzorek. Porušení stavu způsobené zkoušenou látkou kdykoliv během zkoušky tedy často přetrvává až do konce zkoušky.

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Zkouška však není omezena na chemické látky, jejichž koncentraci v životním prostředí lze předpovědět. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se proto stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci uhlíku. Údaje z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x, kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace uhlíku: rozklad organického materiálu působením mikroorganismů, jehož výsledkem je konečný produkt – anorganický oxid uhličitý.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

▼B

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Prosetá půda se buď exponuje zkušební látce, nebo se ponechá neexponovaná (kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentrací na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy smísí s glukosou a po následujících 12 hodinách se měří respirační rychlost vyvolaná glukosou. Respirační rychlost se vyjádří jako uvolněný oxid uhličitý (v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu) nebo jako spotřebovaný kyslík (v mg kyslíku na kg půdy za hodinu). Průměrná respirační rychlost u exponovaných vzorků půd se porovná s rychlostí u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou rovné 25 % nebo větší, v měření se pokračuje ve 14denních intervalech nejdéle do 100 dnů. Při zkoušení jiných chemických látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a respirační rychlost vyvolaná glukosou (tj. průměrné množství uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku) se změří po 28 dnech. Výsledky zkoušek s řadou koncentrací se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi uvolněným oxidem uhličitým nebo spotřebovaným kyslíkem u kontrolních a exponovaných vzorků, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

1.6. POPIS METODY

1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, ktery bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Pro stanovení respirace vyvolané glukosou jsou nezbytné inkubační systémy a přístroje pro měření uvolňovaného oxidu uhličitého nebo spotřeby kyslíku. Příklady takových systémů lze nalézt v literatuře (8, 9, 10, 11).

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

— obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,

— stanoví se mikrobiální biomasa (12, 13) a její obsah uhlíku by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. v důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabité půdy.

1.6.3. **Odběr a skladování vzorků půd**

1.6.3.1. *Odběr*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm). Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. *Skladování*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při –18 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**

1.6.4.1. *Předběžná inkubace*

Pokud byla půda skladována (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.5. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. **Zkušební koncentrace**

Při zkoušení přípravků na ochranu rostlin nebo jiných chemických látek, u nichž lze předpovědět koncentraci v životním prostředí, se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predictable Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky.

U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovované hodnoty EC_x.

▼B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovná množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u exponovaných a kontrolních vzorků a vypočítají se hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odběry vzorků a analýzy půd**

1.7.2.1. *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se rychlost respirace vyvolané glukosou ve vzorcích analyzuje 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah respirace vyvolané glukosou se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jejím konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky. v případě potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít k odhadu výchozího množství metabolicky aktivní mikrobiální biomasy v půdě.

1.7.2.2. *Měření rychlostí respirace vyvolané glukosou*

Pro každý okamžik odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví rychlost respirace vyvolané glukosou. Vzorky půd se smísí s dostatečným množstvím glukosy, aby se ihned vyvolala maximální respirační odezva. Množství glukosy potřebné pro vyvolání maximální respirační odezvy u dané půdy lze stanovit v orientační zkoušce se sérií koncentrací glukosy (14). U písčitých půd s obsahem organického uhlíku od 0,5 do 1,5 % obvykle stačí 2 000 mg až 4 000 mg glukosy na kg sušiny. Glukosu lze rozmělnit na prášek s čistým křemenným pískem (10 g písku na kg sušiny) a homogenně smísit s půdou.

Vzorky půdy obohacené glukosou se inkubují ve vhodné aparatuře, která umožňuje měřit respirační rychlosti při 20 ± 2 °C kontinuálně, každou hodinu, nebo každé dvě hodiny (viz oddíl 1.6.1). Měření uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku se provádí nepřetržitě po dobu 12 hodin a měření se zahájí co nejdříve, tj. do 1 až 2 hodin po přidání glukosy. Změří se celkové množství uvolněného oxidu uhličitého nebo celkové množství spotřebovaného kyslíku za 12 hodin a stanoví se průměrná respirační rychlost.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u každého duplikátního vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Výsledky se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Rychlosti respirace vyvolané glukosou se vyjádří v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo v mg kyslíku na kg sušiny za hodinu. Průměrná rychlost uvolňování oxidu uhličitého nebo průměrná rychlost spotřeby kyslíku u každé expozice se porovná s odpovídajícími hodnotami u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků.

▼B

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Rychlosti respirace vyvolané glukosou (tj. mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo mg kyslíku na kg sušiny za hodinu) zjištěné v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x. Standardními metodami (15, 16, 17) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti (p = 0,95) pro vypočtené hodnoty EC_x.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při kterémkoli odběru po 28 dnech rozdíl respiračních rychlostí při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti u kontroly roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci uhlíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

— zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),

— informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),

— využití půdy (např. zemědělská půda, les atd.),

— hloubka odběru vzorků (cm),

— obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),

— pH (ve vodě),

— obsah organického uhlíku (v % sušiny),

— obsah dusíku (v % sušiny),

— kapacita výměny kationů (mmol/kg),

— výchozí mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,

— odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,

— podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

▼B

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,

— případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,

— počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,

— podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,

— inkubační teplota,

— vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,

— použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),

— počet duplikátních vzorků,

— doby odběru vzorků.

Výsledky:

— metoda a zařízení použité pro měření respiračních rychlostí,

— údaje včetně jednotlivých hodnot a průměrných hodnot množství oxidu uhličitého nebo kyslíku zpracované/ve formě tabulky,

— rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,

— v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— procentuální odchylka v rychlostech respirace vyvolané glukosou pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivost a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,

— v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.

8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.

9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77–81.

12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113–120.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ

1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda je založena na existujících směrnicích (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Postup popsaný v této zkušební metodě je vyvinut pro účely hodnocení aerobní a anaerobní transformace chemické látky v půdě. Účelem experimentů je stanovit i) rychlost transformace zkoušené látky a ii) povahu a rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů, kterým mohou být rostliny a půdní organismy vystaveny. Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které se aplikují přímo do půdy nebo pravděpodobně mohou proniknout do půdního ekosystému. Výsledky těchto laboratorních studií mohou být také použity pro vypracování postupů odběru vzorků a analýzy u podobných polních studií.

Pro vyhodnocení způsobu transformace obvykle postačují aerobní a anaerobní studie s jedním druhem půdy (8, 10, 11). Rychlosti transformace se stanoví alespoň pro tři další půdy (8, 10).

O počtu a druzích půd, které mají být použity v této zkoušce, došo k dohodě na semináři OECD Workshop on soil/sediment Selection v Belgirate v Itálii v roce 1995. Druhy zkušebních půd by měly být reprezentativní pro environmentální podmínky, v nichž dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Například chemické látky, k jejichž uvolnění může dojít v subtropickém až tropickém klimatu, by měly být zkoušeny s ferrasoly nebo nitosoly (systém FAO). Na tomto semináři byla také vydána doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků půd založená na směrnicích ISO (15). Tato metoda se rovněž týká půd rýžových polí.

1.2. DEFINICE

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO_2 a látek, které jsou přítomny ve vázaných reziduích.

Vázaná rezidua: sloučeniny v půdě, rostlině nebo v živočichu, které po extrakci zůstávají v matrici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů) nebo transformačních produktů. Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vyjasnit extrakcí spojenou se změnami v matrici a náročnými analytickými technikami. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (12) (upraveno podle IUPAC 1984 (13)).

Aerobní transformace: reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (14).

▼B

Anaerobní transformace: reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (14).

Půda: směs minerálních a organických chemických složek oživená malými organismy (většinou mikroorganismy), přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Lze pracovat s dvěma formami půdy:

a) s neporušenou půdou, jak v průběhu času vznikla, s charakteristickými vrstvami různých druhů půdy;

b) s porušenou půdou, která se obvykle vyskytuje na obdělávaných polích v případě, že se vzorky odebírají vyrýváním a používají se v této zkušební metodě (14).

Mineralizace: úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2, H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V souvislosti s touto metodou, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se radioisotopy uhlíku oxidují za tvorby odpovídajícího množství $^{14}CO_2$ (14).

Poločas: $t_{0,5,}$ je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT_{50} (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %; liší se od poločasu $t_{0,5}$, pokud transformace neprobíhá podle kinetiky prvního řádu.

DT_{75} (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT_{90} (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %;.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky se použijí pro charakterizaci a/nebo identifikaci transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato je metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro něž je k dispozici analytická metoda s dostatečnou správností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné i nerozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z půdy silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy v půdě udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

▼B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak značené látky. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C, avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část/části molekuly ([1]). Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky na aerobní a anaerobní transformaci v půdě by měly být k dispozici alespoň tyto informace o látce:

a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;

d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);

e) chemická stabilita v temnu (hydrolýza) (metoda C.7);

f) pK_a pokud u molekuly nastává protonace nebo deprotonace (směrnice OECD 112) (16).

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy (zkušební metody C.21 a C.22) (16).

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů.

1.6. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Vzorky půdy se exponují zkušební látce a inkubují se v temnu v biometrických baňkách nebo v průtokových systémech za řízených laboratorních podmínek (při konstantní teplotě a vlhkosti půdy). Ve vhodných intervalech se vzorky půd extrahují a analyzuje se obsah výchozí látky a transformačních produktů. Vhodným absorpčním zařízením se k analýze shromáždí také těkavé produkty. Prostřednictvím materiálu značeného isotopem ^{14}C lze po zachycení uvolněného $^{14}CO_2$ měřit různé rychlosti mineralizace zkoušené látky a dále lze stanovit látkovou bilanci včetně tvorby vázaných reziduí v půdě.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžnost**

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků půdy ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí, měly by se nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (8) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek (3).

([1]) Pokud například zkoušená látka obsahuje jeden kruh, je třeba, aby byl tento kruh označen. Pokud zkoušená látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie s cílem podchytit zbytky každého z kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼B

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů půdy, která byla dostatečně dlouho inkubována, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg půdy (pro zkoušenou látku) nebo 1 % aplikované dávky, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantifikace (LOQ).

1.7.3. **Správnost dat o transformaci/transformačních dat**

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o spolehlivosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50}, popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90}.

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1. **Vybavení a chemická činidla**

Inkubačními systémy jsou statické uzavřené systémy nebo vhodné průtokové systémy (7, 17). Příklady vhodných průtokových inkubačních aparatur a biometrických baněk jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Oba typy inkubačních systémů mají své výhody a svá omezení (7, 17).

Pro zkoušku je nezbytné standardní laboratorní vybavení, zejména:

— analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu značených a neznačených látek pro inverzní isotopovou zřeďovací metodu,

— přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),

— kapalinový scintilační spektrometr,

— okysličovací zařízení pro spalování radioaktivního materiálu,

— odstředivka,

— extrakční aparatura (např. centrifugační zkumavky pro studenou extrakci a Soxhletův přístroj pro kontinuální extrakci s refluxem),

— zařízení pro zkoncentrování roztoků a extraktů (např. rotační odparka),

— vodní lázeň,

— mechanické míchací zařízení (např. hnětací zařízení, rotační mixér).

▼B

Použijí se např. tato chemická činidla:

— NaOH p.a, 2 mol/l, nebo jiná vhodná zásada (např. KOH, ethanolamin),

— H_2SO_4, p.a., 0,05 mol· dm^3,

— ethylenglykol p.a.,

— tuhý absorpční materiál, např. natronové vápno, a polyurethanové zátky,

— organická rozpouštědla čistoty p.a., např. aceton, methanol atd.,

— kapalný scintilátor.

1.8.2. **Aplikace zkoušené látky**

Za účelem aplikace zkoušené látky do půdy a jejího rozptýlení lze zkoušenou látku rozpustit ve vodě (v deionizované nebo destilované vodě) nebo lze v případě potřeby použít co nejmenší množství acetonu nebo jiných organických rozpouštědel (6), ve kterých je zkoušená látka dostatečně rozpustná a stabilní. Zvolené množství rozpouštědla však nesmí mít významný vliv na mikrobiální aktivitu půdy (viz oddíly 1.5 a 1.9.2 až 1.9.3). Rozpouštědla, která působí jako inhibitory mikrobiální aktivity, např. chloroform, dichloromethan a jiná halogenovaná rozpouštědla, nesmějí být použita.

Látku lze do půdy přidat také např. ve směsi s křemenným pískem (6) nebo ve formě malých dílčích vzorků zkušební půdy, které byly předem vysušeny na vzduchu a sterilizovány. Pokud se látka přidává pomocí rozpouštědla, mělo by být rozpouštědlo odpařeno ještě před tím, než jsou k původním nesterilním vzorkům půdy přidány obohacené dílčí vzorky.

U běžně používaných chemických látek, jež se dostávají do půdy prostřednictvím zemědělské aplikace čistírenských kalů, se zkoušená látka nejprve přidá do kalu, který se poté vpraví do vzorku půdy (viz oddíly 1.9.2 a 1.9.3).

Nedoporučuje se rutinně používat přípravky v komerční úpravě. Například u špatně rozpustných látek však může být použití přípravku v komerční úpravě vhodnou alternativou.

1.8.3. **Půdy**

1.8.3.1. *Výběr půd*

Pro stanovení způsobu transformace lze použít reprezentativní půdy; doporučují se písčitohlinitá, prachovitohlinitá, hlinitá nebo hlinitopísčitá půda (podle klasifikace FAO a USDA (18)) o hodnotě pH 5,5 až 8,0 a obsahu organického uhlíku 0,5–2,5 %, přičemž mikrobiální biomasa by měla tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku (10).

Pro studie transformačních rychlostí se použijí alespoň tři další půdy reprezentující rozsah relevantních půd. Půdy by se měly lišit, pokud jde o obsah organického uhlíku, pH, obsah jílu a mikrobiální biomasy (10).

▼B

Všechny půdy by měly být charakterizovány alespoň: strukturou (% písku, % prachu, % jílu) (podle klasifikace FAO a USDA (18)), pH, kationtovou výměnnou kapacitou, organickým uhlíkem, sypnou hustotou, schopností zadržet vodu ([1]) a mikrobiální biomasou (pouze pro aerobní studie). Pro interpretaci výsledků mohou být užitečné další informace o vlastnostech půdy. Pro stanovení vlastností půdy lze použít metody doporučené v literatuře (19, 20, 21, 22, 23). Mikrobiální biomasa se stanoví metodou respirace indukované substrátem (SIR) (25, 26) nebo alternativními metodami (20).

1.8.3.2. *Odběr, příprava a skladování půd*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Těmito informacemi jsou přesná poloha, vegetační kryt, údaje o ošetřování chemickými látkami, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo jiná kontaminace. Pokud byla půda v předchozích čtyřech letech ošetřena zkoušenou látkou nebo látkami s analogickou strukturou, neměla by být použita pro transformační studie (10, 15).

Půda by měla být čerstvě odebraná z terénu (z A horizontu nebo z horní dvaceticentimetrové vrstvy) a měla by být tak vlhká, aby bylo možné snadné prosévání. Kromě půd z rýžových polí by půdy neměly být odebírány v průběhu dlouhých období (více než 30 dnů) sucha, mrazů nebo zavodnění nebo krátce po těchto obdobích (14). Vzorky se přepravují způsobem, který minimalizuje změny obsahu vody v půdě, a uchovávají se v temnu za co největšího přístupu vzduchu. Pro tento účel je obecně vhodný volně uzavřený polyethylenový sáček.

Půda se zpracuje co nejdříve po odběru. Před prosévání na sítu o velikosti 2 mm se z půdy odstraní vegetace, větší živočichové a kameny, při prosévání se půda zbaví malých kamenů, drobných živočichů a zbytků rostlin. Před prosévání by nemělo dojít k nadměrnému vysušení a rozdrcení půdy (15).

Pokud je v zimě obtížné odebrat vzorky v terénu (zmrzlá půda, sněhová pokrývka), mohou být odebrány z půdy skladované ve skleníku pod vegetačním pokryvem (např. zatravněné půdy nebo půdy s travní směsí s jetelem). V každém případě se upřednostňují studie s čerstvě odebranými půdami; pokud má být odebraná a zpracovaná půda před zahájením studie skladována, musí být skladována za odpovídajících podmínek a pouze po omezenou dobu (při 4 ± 2 °C po dobu maximálně tří měsíců), aby byla zachována mikrobiální aktivita ([2]). Podrobné pokyny pro odběr, zpracování a skladování půd pro biotransformační experimenty lze nalézt v literatuře (8, 10, 15, 26, 27).

([1]) Schopnost půdy zadržet vodu lze měřit jako polní kapacitu, jako retenční vodní kapacitu nebo jako vodní sací tlak (pF). Vysvětlení je uvedeno v dodatku 1. V protokolu o zkoušce by mělo být uvedeno, zda byly schopnost půdy zadržet vodu a sypná hustota stanoveny u neporušených polních vzorků, nebo porušených (zpracovaných) vzorků.

([2]) Z výsledků nedávných výzkumů vyplývá, že půdy z mírného pásma lze skladovat při 20 °C déle než tři měsíce (28, 29), aniž dojde k významné ztrátě mikrobiální aktivity.

▼B

Před tím, než se zpracovaná půda použije ve zkoušce, provede se její předběžná inkubace, aby se umožnilo klíčení a odstranila se semena a aby se po změnách podmínek, ke kterým došlo od odběru nebo skladování po nastolení inkubačních podmínek, znovu ustavila rovnováha mikrobiálního metabolismu. Obecně postačuje předběžné inkubační období v délce od 2 do 28 dnů při podmínkách teploty a vlhkosti blížících se podmínkám zkoušky (15). Skladování a předběžná inkubace by dohromady neměly trvat déle než tři měsíce.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

1.9.1.1. *Zkušební teplota*

V průběhu celé zkoušky by měly být půdy inkubovány v temnu při stálé teplotě, která je typická pro klimatické podmínky, ve kterých dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Pro zkoušky všech látek, které se dostávají do půdy v mírném klimatickém pásu, se doporučuje teplota 20 ± 2 °C. Teplota musí být monitorována.

V případě chemických látek aplikovaných nebo uvolňovaných v chladném klimatickém pásu (např. v severských zemích, během podzimu/zimy) se inkubují další vzorky půdy, avšak při nižší teplotě (např. při 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Vlhkost*

Pro transformační zkoušky při aerobních podmínkách se vlhkost ([1]) nastaví a udržuje na hodnotě pF od 2,0 do 2,5 (3). Vlhkost půdy se vyjádří jako hmotnost vody na jednotku hmotnosti sušiny půdy, pravidelně se kontroluje (např. každé 2 týdny) vážením inkubačních baněk a ztráta vody se vyrovnává přidáním vody (nejlépe sterilně filtrované vody z vodovodu). Při upravování vlhkosti je třeba zabránit ztrátám zkoušené látky a/nebo transformačních produktů v důsledku těkání nebo případné fotodegradace, nebo je třeba tyto ztráty minimalizovat.

V případě transformačních zkoušek za anaerobních podmínek a za podmínek rýžového pole se půda nasytí vodou tak, že se zaplaví.

1.9.1.3. *Podmínky aerobní inkubace*

V průtokových systémech se aerobní podmínky udržují občasným propláchnutím nebo nepřetržitým provětráváním zvlhčeným vzduchem. v biometrických baňkách se výměna vzduchu udržuje difuzí.

1.9.1.4. *Sterilní aerobní podmínky*

Za účelem získání informací o možné abiotické transformaci zkoušené látky lze vzorky půdy sterilizovat (metody sterilizace jsou uvedeny v literatuře 16 a 29), exponovat je sterilní zkoušené látce (např. přidáváním roztoku přes sterilní filtr) a provzdušňovat je zvlhčeným sterilním vzduchem, jak je popsáno v oddíle 1.9.1.3. U půd z rýžových polí se půda a voda sterilizuje a inkubace provede způsobem uvedeným v oddílu 1.9.1.6.

([1]) Pro účely dostatečného provzdušňování a výživy půdní mikroflóry by půda neměla být ani příliš vlhká, ani příliš suchá. Vlhkost půdy doporučená pro optimální růst mikroflóry se nachází v rozmezí od 40 % do 60 % retenční vodní kapacity a v rozmezí od 0,1 do 0,33 bar (6). Naposledy uvedený rozsah odpovídá rozsahu pF od 2,0 do 2,5. Typická vlhkost různých druhů půd je uvedena v dodatku 2.

▼B

1.9.1.5. *Podmínky aerobní inkubace*

S cílem nastolit a udržovat anaerobní podmínky se půda, která byla exponována zkoušené látce a inkubována za aerobních podmínek 30 dnů nebo jeden poločas nebo po dobu odpovídající DT_{50} (podle toho, co je kratší), zaplaví vodou (vrstva vody 1–3 cm) a inkubační systém se propláchne inertním plynem (např. dusíkem nebo argonem) ([1]). Zkušební systém musí umožňovat měření pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukčního potenciálu a musí být vybaven zařízením pro zachycování těkavých produktů. Biometrický systém musí být uzavřený, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu difuzí.

1.9.1.6. *Inkubace za podmínek rýžového pole*

Pro účely studia transformace v půdách rýžových polí se půda zaplaví vrstvou vody o výšce asi 1–5 cm a zkoušená látka se aplikuje do vodné fáze (9). Doporučená tloušťka vrstvy půdy je alespoň 5 cm. Systém se provzdušňuje vzduchem jako za aerobních podmínek. Hodnota pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál vodné vrstvy se monitorují a zaznamenávají. Před zahájením transformačních studií je nezbytné alespoň dvoutýdenní předběžné inkubační období (viz oddíl 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Délka zkoušky*

Studie rychlosti a způsobu transformace by neměly za normálních podmínek trvat déle než 120 dnů ([2]) (3, 6, 8), neboť poté by podle očekávání mohlo v umělém laboratorním systému, izolovaném od přirozeného doplňování, postupně docházet ke snižování mikrobiální aktivity půdy. Pokud je to nezbytné pro popis rozkladu zkoušené látky a tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů, lze studie prodloužit (např. na 6 nebo 12 měsíců) (8). Delší inkubační období by měla být zdůvodněna ve zprávě o zkoušce a doplněna měřením biomasy během těchto období a na jejich konci.

1.9.2. **Provedení zkoušky**

Do každé z inkubačních baněk se vpraví asi 50 až 200 g půdy (hmotnost sušiny) (viz obrázky 1 a 2 v příloze 3) a půda se jednou z metod uvedených v oddílu 1.8.2 exponuje zkoušené látce. Pokud se pro účely aplikace zkoušené látky použijí organická rozpouštědla, odstraní se z půdy odpařením. Půda se poté důkladně promíchá špachtlí nebo se baňka protřepe. Pokud se studie provádí za podmínek rýžového pole, půda a voda se po aplikaci zkoušené látky důkladně promísí. Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Alternativní metody jsou uvedeny níže.

([1]) Aerobní podmínky převažují v povrchových půdách a dokonce v podpovrchových půdách, jak ukázal výzkumný projekt podporovaný EU (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17–21 17–21. srpen 1992, Sigtuna, Švédsko). Anaerobní podmínky se mohou vyskytovat jen příležitostně během zaplavení půdy po vydatných srážkách, nebo jsou-li takové podmínky ustaveny na rýžových polích.

([2]) Aerobní studie mohou být ukončeny daleko dříve než za 120 dnů, pokud je v dané době jasně dosaženo konečného transformačního schématu a konečné mineralizace. Zkoušku lze ukončit po 120 dnech, nebo pokud se transformovalo 90 % zkoušené látky, avšak pouze tehdy, vytvořilo-li se alespoň 5 % CO_2.

▼B

Aplikované množství by mělo odpovídat nejvyššímu aplikovanému množství přípravku na ochranu rostlin doporučenému podle pokynů k použití a rovnoměrnému zapravení do vhodné hloubky na poli (např. do horní deseticentimetrové vrstvy půdy ([1]). Například u chemických látek aplikovaných na list nebo do půdy bez zapravení se pro výpočet množství chemické látky, které je třeba přidat do každé baňky, použije hloubka vrstvy půdy 2,5 cm. U chemických látek zapravovaných do půdy je příslušná hloubka specifikována v pokynech pro použití. U chemických látek obecně by mělo být aplikované množství odhadnuto na základě hlavní cesty vstupu do půdy; jsou-li například hlavní cestou vstupu do půdy čistírenské kaly, měla by být chemická látka přidána do kalu v koncentraci, která odráží očekávanou koncentraci v kalu, a množství kalu zapravené do půdy by mělo odpovídat normálnímu množství kalu zapravovanému do zemědělských půd. Pokud tato koncentrace není dostatečná pro identifikaci hlavních transformačních produktů, může napomoci inkubace samostatných půdních vzorků obsahujících vyšší koncentrace, avšak neměly by být používány nadměrné koncentrace, které mají vliv na mikrobiální funkce (viz oddíly 1.5 a 1.8.2).

Jinou možností je expozice velké dávky půdy (tj. 1 až 2 kg), její důkladné promísení vhodným míchacím zařízením a přenesení malých podílů o hmotnosti 50 až 200 g do inkubačních baněk (např. pomocí děliče vzorku). Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Takový postup se upřednostňuje, neboť umožňuje stejnoměrnější rozptýlení zkoušené látky v půdě.

Neexponované vzorky se inkubují za stejných (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy během studií a na jejich konci.

Pokud se látka aplikuje do půdy rozpuštěná v organickém rozpouštědle (organických rozpouštědlech), inkubují se vzorky půdy vystavené témuž množství rozpouštědla (rozpouštědel) za týchž (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy na začátku studií, v jejich průběhu a na jejich konci za účelem kontroly účinků rozpouštědla (rozpouštědel) na mikrobiální biomasu.

Baňky obsahující exponovanou půdu se buď zapojí do průtokového systému popsaného na obrázku 1, nebo se uzavřou absorbční kolonou, jak je uvedeno na obrázku 2 (viz dodatek 3).

([1]) Výpočet výchozí koncentrace na základě plochy se provede takto:

$$C_{půda}[mg/kg] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[ml] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d\left[kg_{půda}/m^3\right]}$$

$C_{půda}$ = výchozí koncentrace v půdě (mg · kg^{-1})

A = aplikační dávka (kg · ha^{-1}); l = tloušťka půdní vrstvy na poli [m]; d = sypná hustota suché půdy (kg · m^{-3}).

Zhruba platí, že aplikační dávka 1 kg · ha^{-1} vede ke koncentraci v půdě přibližně 1 mg · kg^{-1} v 10 cm vrstvě (při předpokládané sypné hustotě 1 g ·cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Odběr vzorků a měření**

V příslušných časových intervalech se vyberou duplikátní inkubační baňky, vzorky půd se extrahují vhodnými rozpouštědly různé polarity a analyzují na zkoušenou látku a/nebo na transformační produkty. U kvalitně připravených studií je k dispozici dostatečný počet baněk, aby bylo možné ke každému odběru vybrat dvě baňky. V různých časových intervalech (v sedmidenních intervalech během prvního měsíce a po prvním měsíci v sedmnáctidenních intervalech) během inkubace každého vzorku půdy a dále na konci inkubace se také odeberou absorpční roztoky nebo tuhé absorpční materiály a analyzují se na těkavé produkty. Kromě vzorku půdy odebraného ihned po aplikaci (vzorek ze dne 0) se provede alespoň dalších 5 odběrů. Časové intervaly se zvolí tak, aby bylo možné stanovit schéma rozkladu zkoušené látky a způsob tvorby a rozkladu transformačních produktů (např. po 0, 1, 3, 7 dnech; po 2, 3 týdnech; po 1, 2, 3 měsících atd.).

V případě zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se spálením kvantitativně stanoví neextrahovatelná radioaktivita a pro každý vzorkovací interval se vypočte látková bilance.

V případě anaerobní inkubace nebo inkubace za podmínek rýžového pole se půda a vodná fáze analyzují na zkoušenou látku a transformační produkty buď společně, nebo se před extrakcí a analýzou oddělí filtrací nebo centrifugací.

1.9.4. **Nepovinné zkoušky**

Pro odhad vlivu teploty a vlhkosti půdy na rychlosti transformace zkoušené látky a/nebo jejích transformačních produktů v půdě mohou být užitečné aerobní nesterilní studie při další teplotě nebo vlhkosti půdy.

O další charakterizaci neextrahovatelné radioaktivity se lze pokusit například použitím metody extrakce tekutinou v nadkritickém stavu.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý vzorkovací interval se uvede množství zkoušené látky, transformačních produktů, těkavých látek (pouze v %) a neextrahovatelných látek v procentech výchozí koncentrace, popřípadě v mg na kg půdy (na hmotnost sušiny). Pro každý vzorkovací interval se uvede látková bilance v procentech použité výchozí koncentrace. Grafické znázornění závislosti koncentrace zkoušené látky na čase umožní provést odhad jejího poločasu transformace nebo hodnoty DT_{50}. Měly by být identifikovány hlavní transformační produkty a sestrojeny křivky závislosti koncentrace na čase, aby se ukázala rychlost jejich tvorby a rozkladu. Hlavním transformačním produktem je jakýkoli produkt, který kdykoli během studie tvoří ≥ 10 % aplikované dávky.

Zachycené těkavé produkty jsou určitým ukazatelem těkavosti zkoušené látky a jejích transformačních produktů z půdy.

▼B

Přesnější stanovení poločasů nebo hodnot DT_{50} a popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} se provede výpočtem za použití vhodného modelu kinetiky. Společně s hodnotami poločasu a DT_{50} se uvede popis použitého modelu kinetiky, řád kinetiky a koeficient determinace (r^2). Pokud není $r^2 < 0,7$ upřednostňuje se kinetika prvního řádu. Podle možnosti se výpočty použijí také na hlavní transformační produkty. Příklady vhodných modelů jsou popsány v literatuře (31 až 35).

V případě studií rychlosti prováděných při různých teplotách se závislost rychlosti transformace na teplotě popíše v rozsahu experimentálních teplot pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ nebo } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

kde ln A a B jsou regresní konstanty získané z úseku na abscise a ze směrnice regresní přímky závislosti ln k na 1/T, kde k je rychlostní konstanta při teplotě T a T je teplota v Kelvinech. Je třeba věnovat pozornost omezení rozsahu teplot, v němž platí Arrheniova rovnice, jestliže transformaci určuje mikrobiální činnost.

2.2. HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Přestože se studie provádějí v umělém laboratorním systému, umožňují výsledky odhadnout rychlost transformace zkoušené látky a rovněž rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů za polních podmínek (36, 37).

Studie transformačního způsobu zkoušené látky poskytuje informaci o způsobu, jakým se mění struktura aplikované látky v půdě působením chemických a mikrobiálních reakcí.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího atomu (značících atomů) při použití radionuklidů) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Referenční látky:

— chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební půdy:

— podrobné údaje o místě odběru,

— datum a postup odběru vzorků půdy,

▼B

— vlastnosti půdy, např. pH, obsah organického uhlíku, struktura (% písku, % prachu, % jílu), kationtová výměnná kapacita, sypná hustota, schopnost zadržet vodu a mikrobiální biomasa,

— doba skladování půdy a podmínky skladování (pokud byla skladována).

Zkušební podmínky:

— datum provedení studií,

— množství aplikované zkoušené látky,

— použitá rozpouštědla a metoda aplikace zkoušené látky,

— hmotnost exponované půdy na začátku zkoušky a hmotnost půdy odebírané pro analýzu v každém intervalu,

— popis použitého inkubačního systému,

— rychlosti průtoku vzduchu (pouze u průtokových systémů),

— zkušební teplota,

— vlhkost půdy během inkubace,

— mikrobiální biomasa na začátku aerobních studií, během nich a na jejich konci,

— pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál na začátku anaerobních studií a studií za podmínek rýžového pole, během nich a na jejich konci,

— metoda (metody) extrakce,

— metody kvantitativního stanovení a identifikace zkoušené látky a hlavních transformačních produktů v půdě a v absorpčních materiálech,

— počet duplikátních vzorků a počet kontrol.

Výsledky:

— výsledky stanovení mikrobiální aktivity,

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— tabulky s výsledky vyjádřenými v % výchozí aplikované dávky, popřípadě v mg na kg půdy (vztaženo na hmotnost sušiny půdy),

— látková bilance během studií a na jejich konci,

— charakterizace neextrahovatelné (vázané) radioaktivity nebo reziduí v půdě,

— kvantifikace uvolněného CO_2 a dalších těkavých sloučenin,

— křivky závislostí koncentrací zkoušené látky, popřípadě hlavních transformačních produktů v půdě na čase,

— poločas nebo hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty včetně příslušných intervalů spolehlivosti,

▼B

— odhad rychlosti abiotického rozkladu za sterilních podmínek,

— posouzení kinetiky transformace pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty,

— případný návrh způsobu transformace,

— diskuse a interpretace výsledků,

— nezpracovaná data (tj. chromatogramy jednotlivých vzorků, příklady výpočtu rychlostí transformace a metody použité pro identifikaci transformačních produktů).

4. **LITERATURA**

1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984)

14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16) Annex v to Dir. 67/548/EEC

17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26: 305 (1962).

19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.

25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.

27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.

28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).

29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).

30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.

33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.

34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.

35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.

36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.

37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼B

DODATEK 1

TLAK VODY, POLNÍ KAPACITY (PK) A RETENČNÍ VODNÍ KAPACITA (RVK) [1]

Výška vodního sloupce (cm)	pF [a]	bar [b]	Poznámky
10^7	7	10^4	Suchá půda
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Bod vadnutí
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Rozpětí polní kapacity [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	RVK (přibližná hodnota)
1	0	0,001	Půda nasycená vodou

[a] pF = dekadický logaritmus výšky vodního sloupce v cm.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Odpovídá přibližnému obsahu vody při složení 10 % písku, 35 % hlíny a 45 % jílu.
[d] Polní kapacita není konstanta, ale mění se v závislosti na druhu půdy od pF 1,5 do 2,5.

Tlak vody se vyjadřuje v cm vodního sloupce nebo v jednotkách bar. Vzhledem k velkému rozpětí se sací tlak vyjadřuje jednoduše jako hodnota pF, která je ekvivalentní logaritmu vodního sloupce v cm.

Polní kapacita je definována jako množství vody, které přírodní půda po delším deštivém období nebo po dostatečném zavlažení udrží proti gravitaci 2 dny. Stanovuje se u neporušené půdy v polním pokusu. Naměřená hodnota tedy není použitelná pro laboratorní vzorky porušené půdy. Hodnoty PK stanovené u porušených půd mohou vykazovat větší systematické odchylky.

Retenční vodní kapacita (RVK) se stanovuje v laboratoři u neporušené i porušené půdy tak, že se kapilárním vzlínáním nasytí sloupec půdy vodou. Využije se zejména u porušených půda může být až o 30 % vyšší než polní kapacita (1). Také se stanovuje snadněji než spolehlivé hodnoty PK.

Poznamky

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATEK 2

VLHKOST PUDY (V G VODY NA 100 G SUSINY) U RUZNÝCH DRUHU PUD Z RUZNÝCH ZEMI

Druh půdy	Země	Vlhkost půdy při		
		RVK (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Písčitá	Německo	28,7	8,8	3,9
Hlinitopísčitá	Německo	50,4	17,9	12,1
Hlinitopísčitá	Švýcarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitohlinitá	Švýcarsko	72,8	56,6	28,4
Jílovitohlinitá	Brazílie	69,7	38,4	27,3
Jílovitohlinitá	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Písčitohlinitá	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitohlinitá	USA	47,2	33,2	18,8
Písčitohlinitá	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Retenční vodní kapacita.

▼B

DODATEK 3

Obrázek 1

Příklad průtokové aparatury pro studium transformace chemických látek v půdě ([1]) ([2])

1: jehlový ventil

2: promývačka s vodou

3: ultramembrána (pouze ve sterilních podmínkách), velikost pórů 0,2 μm

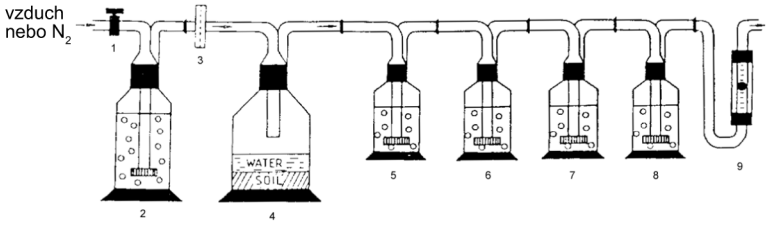
4: baňka pro studium metabolismu v půdě (zalitá vodou pouze v případě anaerobních podmínek a podmínek rýžového pole)

5: baňka s ethylenglykolem pro zachycení organických těkavých sloučenin

6: baňka s kyselinou sírovou pro zachycení alkalických těkavých sloučenin

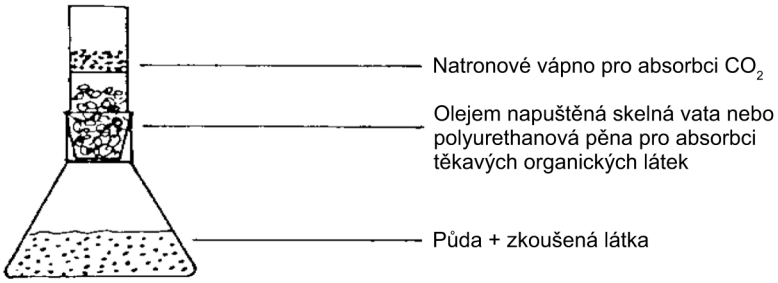
7, 8: zátka z hydroxidu sodného pro zachycení CO_2 a jiných kyselých těkavých látek

9: průtokoměr



Obrázek 2

Příklad biometrické baňky pro studium transformace chemických látek v půdě ([3])



([1]) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In: Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, ed.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, (eds.) J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT

1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemické látky se mohou dostat do mělkých nebo hlubokých povrchových vod cestami, jako jsou přímá aplikace, unášení postřiku, odtok, ukládání odpadu, průmyslové, komunální nebo zemědělské emise a atmosférický spad. V této zkušební metodě je popsán laboratorní postup posouzení aerobní a anaerobní transformace organických chemických látek v systémech voda/sediment. Vychází ze stávajících směrnic (1, 2, 3, 4, 5, 6). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoda na pracovním semináři OECD *Workshop on soil/sediment Selection held at Belgirate*, Itálie, 1995 (7). Zde byla rovněž přijata doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků sedimentů založená na směrnici ISO (8). Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které jsou aplikovány bezprostředně do vody nebo které se mohou dostat do vody výše uvedenými cestami.

Podmínky ve vrchní vodní fázi přírodních systémů voda/sediment jsou často aerobní. Podmínky v povrchové vrstvě sedimentu mohou být buď aerobní, nebo anaerobní, zatímco podmínky hlouběji v sedimentu jsou obvykle anaerobní. S cílem zahrnout všechny tyto možnosti je v tomto dokumentu popsána zkouška jak za aerobních podmínek, tak za anaerobních podmínek. Aerobní zkouškou se simuluje aerobní vodní sloupec nad aerobní vrstvou sedimentu, pod níž leží vrstva s anaerobním gradientem. Anaerobní zkouška simuluje zcela anaerobní systém voda/sediment. Pokud je z okolností zřejmé, že je třeba se odchýlit od těchto doporučení, např. použít nedotčené střední vrstvy sedimentů nebo sedimenty, které mohly být exponovány zkoušenou látkou, existují jiné metody určené k tomuto účelu (9).

1.2. DEFINICE

Ve všech případech je třeba používat mezinárodní soustavu jednotek SI.

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO_2 a vázaných reziduí.

Vázaná rezidua:„vázaná rezidua“ jsou sloučeniny v půdě, rostlinách nebo v živočiších, které po extrakci zůstávají v matrici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů). Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vysvětlit extrakcí spojenou se změnami v matrici a moderními analytickými postupy. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (10) (upraveno IUPAC 1984 (11)).

▼B

Aerobní transformace: (oxidační): reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (12).

Anaerobní transformace: (redukční): reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (12).

Přírodní vody: jsou povrchové vody získané z rybníků, řek, potoků atd.

Sediment: je směs minerálních a organických chemických složek, přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Ukládají se v přírodních vodách a vytvářejí rozhraní s těmito vodami.

Mineralizace: je úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V rámci této zkušební metody, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se značící atomy uhlíku kvantitativně oxidují nebo redukují, přičemž se uvolňuje odpovídající množství $^{14}CO_2$ nebo $^{14}CH_4$.

Poločas, $t_{0,5}$: je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT_{50} (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %.

DT_{75} (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT_{90} (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky by měly být použity pro identifikaci a kvantitativní stanovení transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak látky značené, přičemž značené materiály jsou upřednostňovány. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C, avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část (části) molekuly ([1]). Chemická a/nebo radiochemická čistota látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky by měly být k dispozici tyto informace o látce:

a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta;

([1]) Pokud například látka obsahuje kruh, je třeba tento kruh označit; pokud látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie za účelem stanovení osudu každého z označených kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼B

d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);

e) adsorpční koeficient (podle potřeby K_d, K_f nebo K_{oc}) (metoda C.18);

f) hydrolýza (metoda C.7);

g) disociační konstanta (pK_a) (směrnice OECD 112) (13);

h) chemická struktura zkoušené látky a případně poloha značícího nuklidu.

Poznámka: Ve zprávě se uvede teplota, při které byla měření prováděna.

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy, údaje o snadné nebo vlastní biologické rozložitelnosti a údaje o aerobní a anaerobní transformaci v půdě.

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů ve vodě a sedimentu (viz oddíl 1.7.2).

1.5. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

V metodě popsané v této zkoušce se používají aerobní i anaerobní systémy voda/sediment (viz dodatek 1), které umožňují:

i) měřit rychlost transformace zkoušené látky v systému voda/sediment,

ii) měřit rychlost transformace zkoušené látky v sedimentu,

iii) měřit rychlost mineralizace zkoušené látky a/nebo produktů její transformace (pokud se použije zkoušená látka značená isotopem ^{14}C),

iv) identifikaci a kvantifikace produktů transformace ve vodě a v sedimentu, včetně látkové bilance (pokud se použije značená zkoušená látka),

v) měřit distribuci zkoušené látky a produktů její transformace mezi dvěma fázemi během inkubace v temnu (aby nedošlo např. k vykvetení řas) při konstantní teplotě. Pokud to údaje umožňují, stanoví se poločasy a hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90}, které by však neměly být příliš extrapolovány mimo obor experimentálních hodnot (viz oddíl 1.2).

Pro aerobní i anaerobní studie jsou nezbytné alespoň dva sedimenty a příslušné vodní fáze (7). V některých případech by však měly být použity více než dva systémy voda/sediment, např. u chemických látek, které mohou být přítomny ve sladkovodním i mořském ekosystému.

▼B

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné nebo špatně rozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z vody silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy ve vodě nebo v sedimentu udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

Tato metoda je dosud používána ke studiu transformace chemických látek ve sladkovodním systému voda/sediment, avšak může být v zásadě použita také na estuarní a mořské systémy. Není vhodná k simulaci podmínek v tekoucích vodách (např. řekách) nebo na otevřeném moři.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžnost**

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků systému voda/sediment ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí (pokud se použije značený materiál). Výtěžnosti by se měly nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (6) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek.

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit paralelním provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů (vzorků) vody nebo sedimentu, které byly dostatečně dlouho inkubovány, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce analytické metody (LOD) pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg vody nebo sedimentu (pro zkoušenou látku) nebo 1 % výchozího množství aplikovaného do zkušebního systému, podle toho, která z těchto hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantitativní stanovitelnosti (LOQ).

1.7.3. **Správnost dat o transformaci**

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o správnosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} a popřípadě hodnoty DT_{75} a DT_{90}.

1.8. POPIS METODY

1.8.1. **Zkušební systém a aparatura**

Studie se provede se skleněnými nádobami (např. baňkami, centrifugačními kyvetami), pokud z předběžných informací (např. z rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda, ze sorpčních dat atd.) nevyplývá, že látka může ulpívat na skle; v takovém případě lze zvážit použití náhradního materiálu (např. teflonu). Pokud je o zkoušené látce známo, že ulpívá na skle, lze problém zmírnit jednou z následujících metod:

▼B

— stanovením hmotnosti zkoušené látky a transformačních produktů sorbovaných na skle,

— zajištěním, aby se na konci zkoušky omylo rozpouštědlem veškeré laboratorní sklo,

— použitím komerční úpravy přípravků (viz také oddíl 1.9.2),

— použitím většího množství pomocného rozpouštědla za účelem přidání zkoušené látky do systému; pokud se použije pomocné rozpouštědlo, nesmí štěpit zkoušenou látku solvolýzou.

Příklady typických zkušebních aparatur, tj. průtokové a biometrické systémy, jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3 (14). Jiné užitečné inkubační systémy jsou popsány v literatuře (15). Experimentální aparatura by měla být konstruována tak, aby byla možná výměna vzduchu nebo dusíku a zachycení těkavých produktů. Rozměry aparatury musí splňovat požadavky zkoušky (viz oddíl 1.9.1). Ventilace musí být zajištěna buď jemným probubláváním, nebo prohánění vzduchu nebo dusíku nad hladinou vody. V druhém případě se doporučuje vodu seshora mírně promíchávat, aby docházelo k lepší distribuci kyslíku nebo dusíku ve vodě. Neměl by se použít vzduch zbavený CO_2, neboť by došlo ke zvýšení pH vody. V žádném případě není žádoucí, aby došlo ke zvíření sedimentu, a je tomu třeba pokud možno zabránit. Slabě těkavé chemické látky se zkoušejí v biometrickém systému za mírného promíchávání vodní hladiny. Lze rovněž použít uzavřené nádobky s volným objemem pod víčkem vyplněným atmosférickým vzduchem nebo dusíkem a vnitřní ampulky pro zachycování těkavých produktů (16). U aerobních zkoušek je nezbytná pravidelná výměna plynu pod víčkem, aby se vyrovnávala spotřeba kyslíku biomasou.

Mezi vhodné lapače pro shromažďování těkavých transformačních produktů patří kromě jiných roztok hydroxidu draselného nebo sodného o koncentraci 1 mol/dm^3 pro zachycování oxidu uhličitého ([1]) a ethylenglykol, ethanolamin nebo 2 % parafin v xylenu pro organické sloučeniny. Těkavé látky vznikající za anaerobních podmínek, např. methan, lze zachycovat na molekulovém sítu. Tyto těkavé látky lze spálit např. na CO_2 v křemenné trubičce za přítomnosti CuO při teplotě 900 °C a vzniklý CO_2 lze zachytit v absorbéru s alkálií (17).

Pro chemickou analýzu zkoušené látky a transformačních produktů jsou nezbytné laboratorní přístroje (např. přístroje pro plynovou chromatografii s kapalinovou stacionární fází (GLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC), hmotnostní spektrometrii (MS), kombinaci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS), kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS), jadernou magnetickou rezonanci (NMR) atd.), včetně detekčních systémů pro detekci sloučenin značených nebo neznačených radioisotopy. Pokud se použije materiál značený radioisotopy, je třeba mít k dispozici scintilační spektrometr a zařízení pro spalování za přítomnosti oxidačního činidla (pro spalování vzorků sedimentů před analýzou radioaktivity).

Další standardní laboratorní vybavení pro fyzikálněchemická a biologická měření (viz oddíl 1.8.2.2 tabulka 1), laboratorní sklo, chemikálie a činidla se použijí podle potřeby.

([1]) Vzhledem k tomu, že alkalické roztoky absorbují oxid uhličitý ze vzduchu určeného k provzdušňování a oxid uhličitý uvolňující se respirací v aerobních experimentech, musí být pravidelně vyměňovány, aby se nevyčerpala jejich absorpční kapacita.

▼B

1.8.2. **Výběr a počet vodních sedimentů**

Místa odběru by měla být vybrána podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru místa odběru vzorků musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo komunálních vstupů do povodí a do horních toků. Sedimenty by neměly být použity, pokud byly v předchozích 4 letech kontaminovány zkoušenou látkou nebo jejími strukturními analogy.

1.8.2.1. *Výběr sedimentů*

Pro aerobní studie se obvykle použijí dva sedimenty (7). Tyto dva vybrané sedimenty by se měly lišit co do obsahu organického uhlíku a struktury. Jeden sediment by měl mít vysoký obsah organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturu a druhý sediment by měl mít nízký obsah organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturu. Obsah organického uhlíku by se měl zpravidla lišit alespoň o 2 %. „Jemná struktura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) ([1]) vyšším než 50 % a „hrubá textura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) nižším než 50 %. Rozdíl v obsahu složek (jíl + prach) u obou sedimentů by měl být zpravidla alespoň 20 %. V případě, že se může chemikálie dostat do mořských vod, měl by alespoň jeden systém voda/sediment pocházet z moře.

Pro přísně anaerobní studie by měly být odebrány dva sedimenty (včetně okolní vody) z anaerobních zón povrchových vod (7). Se sedimentem i vodní fází by mělo být zacházeno opatrně a měly by být přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku.

Pro výběr sedimentu mohou být důležité i jiné parametry, které by měly být zvažovány případ od případu. Rozpětí pH sedimentů je například důležité pro zkoušení chemikálií, u nichž transformace a/nebo sorpce mohou záviset na pH. Závislost sorpce na pH by se mohla odrážet v hodnotě pK_a zkoušené látky.

1.8.2.2. *Charakterizace vzorků systému voda/sediment*

Klíčové parametry, které musí být jak u vody, tak u sedimentu měřeny a uvedeny ve zprávě (s odkazem na použitou metodu), a fáze zkoušky, ve které mají být měřeny, jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. Metody stanovení těchto parametrů jsou pro informaci uvedeny v literatuře (18, 19, 20, 21).

Kromě toho může být případ od případu nezbytné měřit a uvádět další parametry (např. u sladkovodního systému: obsah částic, alkalita, tvrdost, vodivost, NO_3/PO_4 (poměr jednotlivých hodnot); u sedimentů: kationtová výměnná kapacita, retenční vodní kapacita, obsah uhličitanů, celkový obsah dusíku a fosforu; u mořských systémů: salinita). Pro posouzení oxidačně-redukčních podmínek, a zejména v souvislosti s anaerobní transformací, může být také užitečná analýza sedimentů a vody na dusičnany, sírany, biologicky dostupné železo, popřípadě na jiné akceptory elektronů.

([1]) (Jíl + prach) je minerální frakce sedimentu s velikostí částic < 50 μm.

▼B

Měření parametrů pro charakterizaci vzorků systémů voda/sediment (7, 22, 23)

Parametr	Fáze zkušebního postupu					
	odběr v terénu	manipulace po odběru	zahájení aklimatizace	zahájení zkoušky	samotná zkouška	konec zkoušky
Voda						
Původ/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Koncentrace O_2 (*)	x		x	x	x	x
Oxidačně-redukční potenciál (*)			x	x	x	x
Sediment						
Původ/zdroj	x					
Hloubka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuce částic		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobiální biomasa (**)		x		x		x
Oxidačně-redukční potenciál (*)	Pozorování (barva/zápach)		x	x	x	x

(*) Výsledky nedávných výzkumů ukázaly, že měření koncentrace kyslíku ve vodě a oxidačně-redukčního potenciálu vody nemají vypovídací hodnotu, pokud jde o mechanismus růstu a vývoje mikrobiální populace v povrchových vodách, a nemají ani předpovědní hodnotu (24, 25). Stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BOD, při odběru vzorků v terénu a při zahájení a na konci zkoušky) a koncentrace mikro- a makroživin Ca, Mg a Mn ve vodě (při zahájení a na konci zkoušky) a měření celkového obsahu N a P v sedimentech (při odběru vzorků v terénu a na konci zkoušky) může být lepším nástrojem pro interpretaci a hodnocení rychlosti a způsobů aerobní biotransformace.

(**) Metoda měření rychlosti mikrobiální respirace (26), fumigační metoda (27) nebo měření počtu mikroorganismů (např. bakterií, aktinomycet, plísní a celkového počtu kolonií) pro aerobní studie; rychlost methanogeneze u anaerobních studií.

1.8.3. **Odběr vzorků, manipulace s nimi a jejich skladování**

1.8.3.1. *Odběr*

Vzorky sedimentu se odeberou podle návrhu směrnice ISO pro odběr vzorků sedimentů ze dna (8). Vzorky se odeberou z celé 5 až 10 cm silné horní vrstvy sedimentu. Současně se sedimentem se odebere z téhož místa i vzorek okolní vody. U anaerobní studie musí být sediment a okolní voda odebrány a přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku (28) (viz oddíl 1.8.2.1). V literatuře je popsáno několik odběrových zařízení (8, 23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulace*

Sediment se oddělí od vody filtrací a poté se pomocí přebytku vody z místa odběru prosévá za mokra na 2mm sítu; voda se poté odstraní. Následně se v inkubační baňce v požadovaném poměru (viz oddíl 1.9.1) smísí známé množství sedimentu a vody a směs se připraví pro aklimatizaci (viz oddíl 1.8.4). U anaerobní studie musí být všechny kroky prováděny s vyloučením přístupu kyslíku (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Skladování*

V každém případě se doporučuje používat čerstvě odebraný sediment a vodu; je-li však skladování nezbytné, sediment s vodou se proseje výše popsaným způsobem a zalitý vodou (vrstva vody 6–10 cm) se skladuje v temnu při 4 ± 2 °C (4) maximálně 4 týdny (7, 8, 23). Vzorky pro aerobní studie se skladují za volného přístupu vzduchu (např. v otevřených nádobách), zatímco vzorky pro anaerobní studie se skladují s vyloučením přístupu kyslíku. Při přepravě a skladování nesmí sediment a voda zmrznout a sediment nesmí být vysušován.

1.8.4. **Příprava vzorků sedimentu/vody ke zkoušce**

Před přidáním zkoušené látky musí proběhnout aklimatizace, při níž musí být vzorky sedimentu/vody umístěny v inkubační nádobě, která se použije při hlavní zkoušce; podmínky aklimatizace musí být totožné s podmínkami inkubace při zkoušce (viz oddíl 1.9.1). Doba aklimatizace je čas nezbytný pro dostatečnou stabilizaci systému, kterou lze posoudit podle pH, koncentrace kyslíku ve vodě, oxidačně-redukčního potenciálu sedimentu a vody a makroskopické separace fází. Doba aklimatizace není obvykle delší než jeden až dva týdny a neměla by překročit čtyři týdny. Výsledky měření provedených během této doby se uvedou ve zprávě.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

Zkouška se provede v inkubační aparatuře (viz oddíl 1.8.1) s poměrem objemu vody a sedimentu 3:1 až 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Doporučené minimální množství sedimentu na inkubační nádobu je 50 g (hmotnost sušiny).

Zkouška se provádí v temnu za konstantní teploty v rozmezí 10 až 30 °C. Vhodná je teplota 20 ± 2 °C. Podle potřeby lze případ od případu v závislosti na zaměření zkoušky zvolit jinou, nižší teplotu (např. 10 °C). Inkubační teplota se sleduje a uvede se ve zprávě.

([1]) Z nedávných studií vyplývá, že skladování při 4 °C může vést k poklesu obsahu organického uhlíku v sedimentu, který by mohl případně vést k poklesu mikrobiální aktivity.

▼B

1.9.2. **Úprava zkoušené látky a její aplikace**

Použije se jedna zkušební koncentrace chemické látky ([1]). U přípravků na ochranu rostlin aplikovaných přímo do vodního tělesa se použije maximální dávkování uvedené na etiketě jako maximální aplikovaná dávka vypočtená podle plochy hladiny vody ve zkušební nádobě. Ve všech ostatních případech se použije koncentrace založená na odhadech emisí do životního prostředí. Je třeba spolehlivě zajistit, aby byla aplikována dostatečná koncentrace zkoušené látky pro charakterizaci postupu transformace a tvorby a odbourávání transformačních produktů. v situaci, kdy se koncentrace zkoušené látky na začátku studie blíží mezím detekce a/nebo kdy by nebylo možné detekovat hlavní transformační produkty, jsou-li přítomny v množství odpovídajícím 10 % výchozí aplikované dávky, může být nezbytné aplikovat vyšší dávky (např. desetkrát vyšší). Použité vyšší koncentrace však nesmí mít značně nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu voday/sedimentu. S cílem dosáhnout konstantní koncentrace v nádobách různých rozměrů může být nezbytné upravit množství použitého materiálu, přičemž se vychází z výšky vodního sloupce v nádobě v poměru k hloubce vody v odběrovém místě (předpokládá se hloubka 100 cm, možná je však i jiná hloubka). Příklad výpočtu je uveden v příloze 4.

V ideálním případě se zkoušená látka aplikuje do vodné fáze zkoušeného systému ve formě vodného roztoku. Je-li to nevyhnutelné, je přípustné použít pro aplikaci a rozptýlení zkoušené látky malé množství rozpouštědla mísitelného s vodou (např. acetonu nebo ethanolu), avšak jeho množství by nemělo překročit 1 % (obj.); rozpouštědlo by nemělo mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému. Přípravě vodného roztoku zkoušené látky je třeba věnovat pozornost a k zajištění naprosté homogenity může být vhodné použít generátorové kolony a předem připravené směsi. Po přidání vodného roztoku do zkušebního systému se doporučuje vodnou fázi mírně promíchat tak, aby se sediment zvířil co nejméně.

Použití komerčních úprav přípravků se v zásadě nedoporučuje, neboť složky přípravku mohou mít vliv na rozptýlení zkoušené látky a/nebo transformačních produktů mezi vodu a sediment. U špatně rozpustných zkoušených látek však může být použití komerční úpravy vhodnou možností.

Počet inkubačních nádob závisí na počtu intervalů, v nichž mají být prováděny odběry (viz oddíl 1.9.3). Je třeba nasadit dostatečný počet zkušebních systémů, aby bylo možné v každém intervalu vyhodnotit dva systémy. Použijí-li se pro každý systém voda/sediment kontrolní systémy, neexponují se zkoušené látce. Kontrolní systémy lze použít pro stanovení mikrobiální biomasy sedimentu a celkového organického uhlíku ve vodě na konci studie. Dva kontrolní systémy (tj. po jednom kontrolním systému z každého systému voda/sediment) mohou být použity pro sledování požadovaných parametrů v sedimentu a ve vodě v průběhu aklimatizace (viz tabulka v oddílu 1.8.2.2). Dva další kontrolní systémy musí být nasazeny za účelem měření nepříznivých účinků na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému v případě, že se zkoušená látka aplikuje pomocí rozpouštědla.

([1]) Zkouška s druhou koncentrací může být užitečná u chemických látek, které se dostávají do vod různými cestami, a vykazují tedy významně odlišné koncentrace, pokud lze nižší koncentraci analyzovat s dostatečnou správností.

▼B

1.9.3. **Délka zkoušky a odběry vzorků**

Délka experimentu by neměla překročit 100 dnů (6) a experiment by měl trvat tak dlouho, dokud se nestanoví způsob rozkladu a rozptýlení ve vodě/sedimentu, nebo dokud se transformací a/nebo těkáním nevyčerpá 90 % zkoušené látky. Odběr by měl být proveden nejméně šestkrát za sebou (včetně času 0), přičemž vhodný režim odběrů a délka zkoušky se stanoví nepovinnou orientační studií (viz oddíl 1.9.4), nejsou-li k dispozici dostačující údaje o zkoušené látce z dřívějších studií. U hydrofobních zkoušených látek může být potřeba dodatečným vzorkováním v průběhu počáteční fáze studie zjistit stupeň rozptýlení mezi vodu a sediment.

V příslušnou dobu se k analýze odebere celý obsah inkubačních nádob (včetně duplikátních nádob). Sediment a voda nad sedimentem se analyzují zvlášť ([1]). Voda se za minimálního zvíření sedimentu opatrně odebere. Vhodnými analytickými postupy se provedou extrakce a charakterizace zkoušené látky a transformačních produktů. Je třeba také pečlivě shromáždit materiál, který může být adsorbován na inkubační nádobě nebo ve spojovacích trubičkách použitých k zachycení těkavých látek.

1.9.4. **Nepovinná orientační zkouška**

Nelze-li délku a režim odběrůodhadnout z jiných relevantních studií zkoušené látky, může se provést předběžná zkouška za týchž zkušebních podmínek, jaké jsou navrženy pro hlavní studii. Příslušné podmínky a výsledky orientační zkoušky, pokud byla provedena, by měly být stručně uvedeny ve zprávě.

1.9.5. **Měření a analýza**

Pro každý jednotlivý odběr se provede měření koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů ve vodě a v sedimentu a výsledky se uvedou ve zprávě (jako koncentrace a v procentech aplikovaného množství). V zásadě by měla být při každém odběru provedena identifikace transformačních produktů, které obsahují ≥ 10 % radioaktivity aplikované do celého systému voda/sediment, nejsou-li dostatečné důvody pro jiný postup. Měly by být také identifikovány transformační produkty, jejichž koncentrace se v průběhu studie nepřetržitě zvyšuje, třebaže nedosahuje výše uvedené meze, neboť to může znamenat, že se jedná o perzistentní produkty. Tento postup by měl být zvážen případ od případu a ve zprávě by měl být odůvodněn.

Pro každý jednotlivý odběr se uvedou výsledky ze systémů pro zachycování plynů/těkavých látek (CO_2 a jiných těkavých organických sloučenin). Uvede se rychlost mineralizace. Pro každý jednotlivý odběr se uvedou neextrahovatelná (vázaná) rezidua v sedimentu.

([1]) Může-li snadno docházet k rychlé opětovné oxidaci produktů anaerobní transformace, měly by být během odběru a analýzy zachovány anaerobní podmínky.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý jednotlivý odběr se vypočte celková látková bilance nebo výtěžnost (viz oddíl 1.7.1) přidané radioaktivity. Výsledky se uvedou v procentech přidané radioaktivity. Pro každý jednotlivý odběr se uvede rozptýlení radioaktivity mezi vodu a sediment (vyjádřeno v koncentracích a v procentech).

Pro zkoušenou látku se vypočítá poločas a hodnoty $DT_{50,}$ případně hodnoty DT_{75} a DT_{90} a intervaly spolehlivosti těchto hodnot (viz oddíl 1.7.3). Vhodnými hodnotícími nástroji lze zjistit míru zániku zkoušené látky ve vodě a v sedimentu. Může jít o použití zdánlivé kinetiky prvního řádu, o techniky proložení empirické křivky za použití grafického nebo numerického řešení a o složitější hodnocení, např. pomocí modelu s jednou nebo více složkami. Další podrobné informace lze získat z příslušné publikované literatury (35, 36, 37).

Všechny přístupy mají své silné a slabé stránky a značně se liší z hlediska komplexnosti. Použití kinetiky prvního řádu může být sice přílišným zjednodušením procesu rozkladu a distribuce, vede však v ideálním případě k hodnotám (rychlostní konstantě nebo poločasu), které jsou snadno srozumitelné a mají význam pro simulační modelování a výpočet předpokládaných koncentrací v životním prostředí. Empirický přístup nebo lineární transformace mohou vést k lepšímu proložení dat křivkami, a tedy k lepšímu odhadu poločasů, hodnot $DT_{50,}$ případně DT_{75} a DT_{90}. Použití odvozených konstant však má své meze. Složkové modely mohou poskytovat řadu užitečných konstant, které jsou důležité pro posouzení rizika a pro popis rozkladu chemické látky v různých složkách a pro její distribuci. Použijí se rovněž pro odhad rychlostních konstant tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů. v každém případě však musí být volba metody odůvodněna a experimentátor by měl graficky nebo statisticky prokázat její oprávněnost.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího nuklidu u látek značených radionuklidy) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a molární aktivita.

▼B

Referenční látky:

— chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební sedimenty a vody:

— lokalita a popis místa/míst odběru sedimentu a vody, pokud možno včetně dřívější kontaminace,

— všechny informace týkající se odběru, případného skladování a aklimatizace systému voda/sediment,

— charakteristiky vzorků systému voda/sediment, jak jsou uvedeny v tabulce v oddílu 1.8.2.2.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební systém (např. průtokový systém, biometrický systém, způsob provzdušňování, míchání, objem vody, hmotnost sedimentu, tloušťka vrstvy vody i sedimentu, rozměry zkušebních nádob atd.),

— aplikace zkoušené látky do systému: použitá zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a kontrol, způsob aplikace zkoušené látky (např. případné použití rozpouštědla) atd.,

— inkubační teplota,

— doby odběru,

— metody extrakce a účinnosti extrakce, analytické metody a meze detekce,

— metody charakterizace/identifikace transformačních produktů,

— odchylky od zkušebního postupu nebo zkušebních podmínek.

Výsledky:

— původní číselná data reprezentativních analýz (všechna původní data musí být uložena v archivu vedeném podle zásad správné laboratorní praxe),

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— výsledky pro zkoušenou látku, popřípadě i pro transformační produkty a neextrahovatelnou radioaktivitu, zpracované v tabulkové formě a vyjádřené v % aplikované dávky a v mg/kg pro vodu, sediment a celý systém (pouze v %),

— látková bilance během studií na jejich konci,

— grafické schéma transformace ve vodě a sedimentu a v celém systému (včetně mineralizace),

— rychlosti mineralizace,

▼B

— poločas, hodnoty DT_{50} a popřípadě DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty, včetně intervalů spolehlivosti, pro vodu, sediment a celý systém,

— charakteristika kinetiky transformace zkoušené látky, popřípadě i hlavních transformačních produktů,

— případný návrh způsobu transformace,

— diskuse o výsledcích.

4. **LITERATURA**

1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. 35–37.

5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162–3, Anaerobic aquatic metabolism.

6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. (ed. Dr. Mark R. Lynch.) SETAC-Europe, Brussels.

7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem*. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (přijato 12. května 1981).

13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C., Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

15) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (ed. D. H. Hutson, T. R. Roberts), Vol. 1, 85–114. J. Wiley & Sons.

16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem*. 16, 631–637.

17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661–667.

18) Black, C. A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17. vyd.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20) Rowell, D. L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

21) Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chem.* 44, 1038–1039.

22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3.–4. června 1991.

23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8.–10. listopadu 1993. (ed. I. R. Hill, P. Matthiessen, F. Heimbach).

24) Vink, J. P. M., van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858–2868.

25) Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S. E. A. T. M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol*, 329–338.

26) Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. *Soil Biol. Biochem*. 17, 197–203.

27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

28) Beelen, P. Van, F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull*. 24 (1), 13–21.

29) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol*. 47, 850–857.

30) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere*, 19, 1527–1550.

31) Pagga, U., Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemoshpere*, 27, 1499–1509.

▼B

32) Nuck, B. A., Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol*. 30, 3597–3603.

33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34) Sijm, Haller, Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol*. 58, 961–968.

35) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187–203.

36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47–60.

37) Carlton, R.R., Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349–1354.

▼B

DODATEK 1

POKYNY K AEROBNÍM A ANAEROBNÍM ZKUŠEBNÍM SYSTÉMŮM

Aerobní zkušební systém

Aerobní zkušební systém popsaný v této zkušební metodě se skládá z aerobní vodní vrstvy (typická koncentrace kyslíku v rozmezí od 7 do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, která je na povrchu aerobní a pod povrchem anaerobní (typické průměrné oxidačně-redukční potenciály (E_h) v anaerobní zóně sedimentu jsou v rozmezí – 80 až – 190 mV). Nad vodní hladinu v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený vzduch, aby se v prostoru pod víčkem udržovala dostatečná koncentrace kyslíku.

Anaerobní zkušební systém

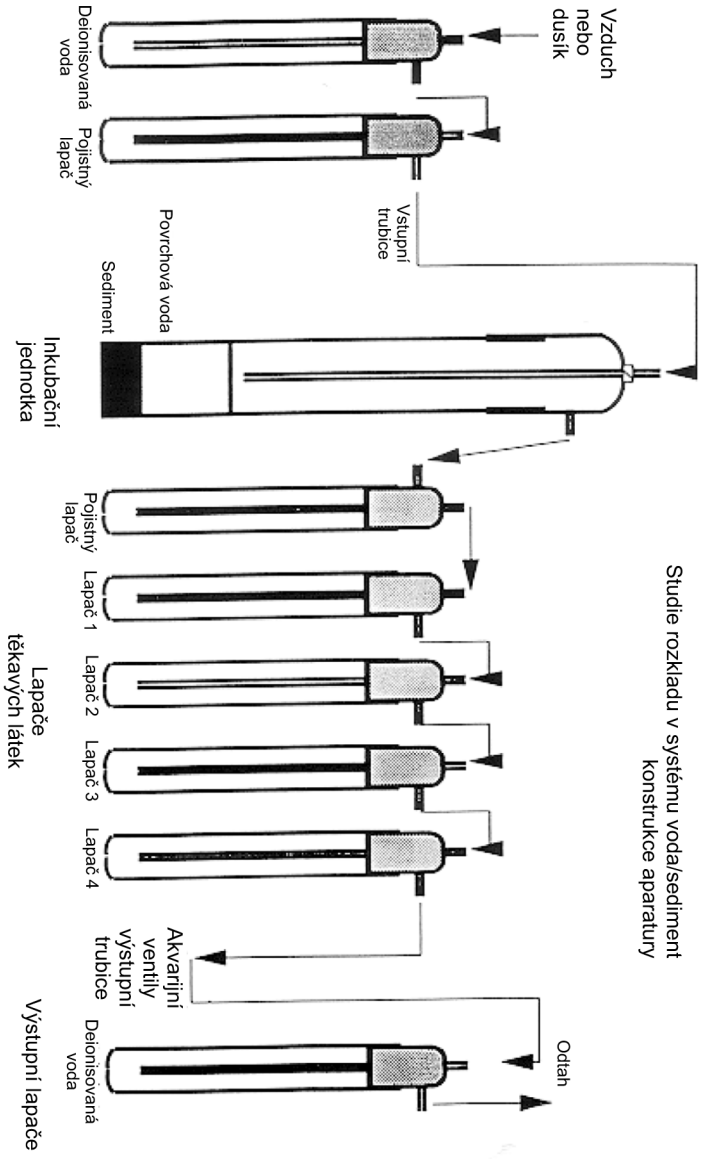
Pro anaerobní zkušební systém je zkušební postup v podstatě tentýž, jako postup popsaný pro aerobní systém, liší se však tím, že nad hladinu vody v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený dusík, aby se udržovala jeho koncentrace v prostoru pod víčkem. Sediment a voda jsou považovány za anaerobní, pokud je oxidačně-redukční potenciál (E_h) nižší – 100 mV.

V anaerobní zkoušce se mineralizace posuzuje na základě měření uvolněného oxidu uhličitého a methanu.

▼B

DODATEK 2

PŘÍKLAD SKLENĚNÉ PRŮTOKOVÉ APARATURY

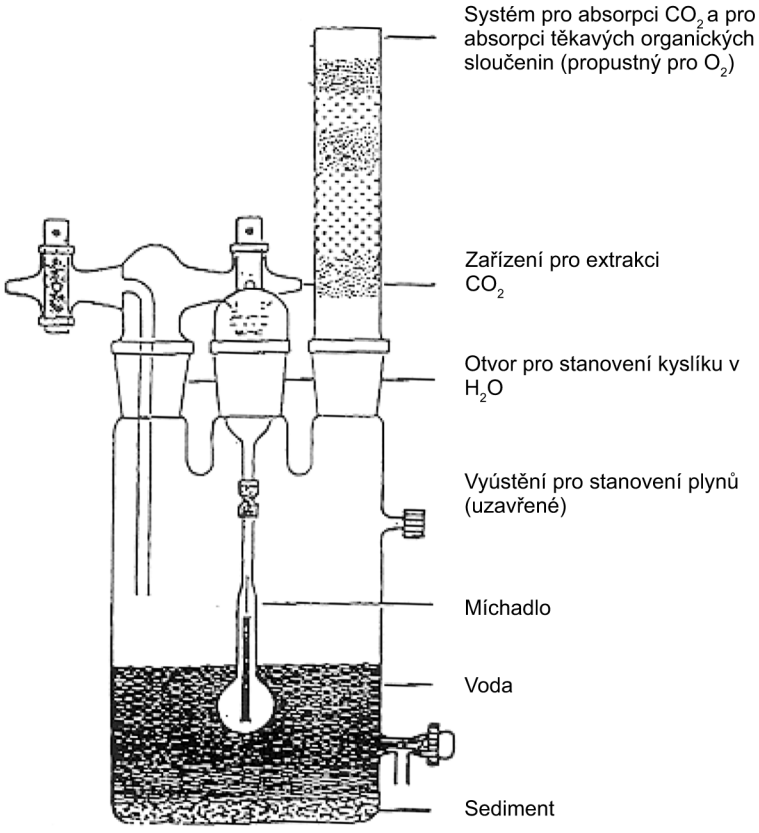


Pojistný lapač: prázdný
Lapač 1:
ethylenglykol pro zachycení organických těkavých látek
Lapač 2:
0,1 M kyselina sírová k zachycení alkalických těkavých látek
Lapače 3 a 4:
2 M hydroxid sodný k zachycení CO_2 jiných kyselých těkavých látek

▼B

DODATEK 3

PŘÍKLAD BIOMETRICKÉ APARATURY



Magnetická míchačka

▼B

DODATEK 4

PŘÍKLAD VÝPOČTU DÁVKY APLIKOVANÉ DO ZKUŠEBNÍCH NÁDOB

Vnitřní průměr válce:	= 8 cm
Výška vodního sloupce bez sedimentu:	= 12 cm
Plocha hladiny: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Dávkování: 500 g zkoušené látky na ha odpovídá 5 $\mu g/cm^2$	
Celkové množství v µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Přepočet celkového množství na hloubku 100 cm:	
$12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Objem vodního sloupce: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrace ve vodě: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml nebo 50 µg/l

▼M1

C.25 AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 309 (2004) (1).

1.1 ÚVOD

Cílem této zkoušky je změřit časový průběh biologického rozkladu zkoušené látky při nízké koncentraci v aerobní přírodní vodě a kvantifikovat pozorování ve formě výrazů pro kinetickou rychlost. Tato simulační zkouška je dávková zkouška v laboratorní třepací lahvi pro stanovení rychlostí aerobního biologického rozkladu organických látek ve vzorcích přírodní povrchové vody (sladkovodní, brakické nebo mořské). Je založena na ISO/DIS 14592–1 (2) a rovněž obsahuje prvky ze zkušebních metod C.23 a C.24 (3) (4). Volitelně při dlouhých zkušebních časech je dávkové zkoušení nahrazeno polospojitou zkouškou s cílem zabránit zhoršení zkušebního mikrokosmu. Základním cílem simulační zkoušky je určit mineralizaci zkoušené látky v povrchové vodě a mineralizace tvoří základnu pro vyjádření kinetiky rozkladu. Ovšem volitelným sekundárním cílem zkoušky je získat informace o primárním rozkladu a tvorbě významnějších transformačních produktů. Určení transformačních produktů, a bude-li to možné, kvantitativní stanovení jejich koncentrací jsou zvláště důležité pro látky, které jsou velmi pomale mineralizované (např. s poločasy pro celkový zbytkový ^{14}C překračující 60 dnů). Pro určení a kvantitativní stanovení významnějších transformačních produktů by se vzhledem k analytickým omezením měly obvykle používat vyšší koncentrace zkoušené látky (např. > 100 μg/l).

Nízká koncentrace v této zkoušce znamená koncentraci (např. méně než 1 μg/l až 100 μg/l), která je dostatečně nízká na to, aby zajistila, že kinetika biologického rozkladu získaná ve zkoušce odráží kinetiku očekávanou v životním prostředí. V porovnání s celkovou hmotností biologicky rozložitelných uhlíkových substrátů dostupných v přírodní vodě používané pro zkoušku slouží zkoušená látka přítomná v nízké koncentraci jako sekundární substrát. To znamená, že očekávaná kinetika biologického rozkladu je prvního řádu („nerůstová“ kinetika) a že zkoušená látka může být rozkládána „spolumetabolismem“. Z kinetiky prvního řádu vyplývá, že rychlost rozkladu (mg/l/den) je přímo úměrná koncentraci substrátu, která s časem klesá. Při opravdové kinetice prvního řádu je specifická rychlostní konstanta rozkladu, k, nezávislá na času a koncentraci. To znamená, že k se znatelně nemění během doby experimentu a nemění se s rostoucí koncentrací během experimentů. Z definice je specifická rychlostní konstanta rozkladu rovna relativní změně koncentrace za čas: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Ačkoliv se za předepsaných podmínek normálně očekává kinetika prvního řádu, mohou nastat určité okolnosti, za kterých se projeví kinetiky jiných řádů. Odchylky od kinetiky prvního řádu lze pozorovat například tehdy, jestliže rychlost biologické transformace omezuje spíše než biologická reakční rychlost jev spojený s přenosem hmoty, například rychlost difuse. Ovšem údaje lze téměř vždy popsat kinetikou pseudoprvního řádu a přijmout rychlost závislou na koncentraci jako konstantní.

▼M1

Informace o biologické rozložitelnosti zkoušené látky při vyšších koncentracích (např. ze standardních screeningových zkoušek) společně s informacemi o abiotické rozložitelnosti, transformačních produktech a relevantních fyzikálně-chemických vlastnostech by měly být dostupné před zkouškou jako pomůcka pro vypracování plánu experimentu a interpretaci výsledků. Použití zkoušených látek značených isotopem ^{14}C a stanovení fázové distribuce ^{14}C na konci zkoušky umožňuje stanovení úplné biologické rozložitelnosti. Při použití neznačené zkoušené látky lze úplný biologický rozklad pouze odhadovat, pokud se zkouší vyšší koncentrace a jsou známy všechny významnější transformační produkty.

1.2 DEFINICE

Primární biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu chemické identity.

Funkční biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu specifické vlastnosti.

Úplný aerobní biologický rozklad: rozložení chemické látky působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků (mineralizace) a tvorba nové biomasy a organických mikrobiálních produktů biologické syntézy.

Mineralizace: rozložení chemické látky nebo organické hmoty působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků.

Fáze iniciace: doba od počátku zkoušky do dosažení adaptace rozkládajících mikroorganismů a zvýšení stupně biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty na detekovatelnou úroveň (např. 10 % maximálního teoretického biologického rozkladu nebo nižší v závislosti na přesnosti techniky měření).

Maximální úroveň biologického rozkladu: stupeň biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty při zkoušce uváděný v procentech, při jehož překročení neprobíhá během zkoušky žádný další biologický rozklad.

Primární substrát: soubor přírodního uhlíku a zdrojů energie, který zajišťuje růst a udržování mikrobiální biomasy.

Sekundární substrát: substrátová složka přítomná v tak nízké koncentraci, že svými rozkladem dodává pouze nevýznamná množství uhlíku a energie kompetentním mikroorganismům v porovnání s uhlíkem a energií dodávanou rozkladem hlavních složek substrátu (primárních substrátů).

Rychlostní konstanta rozkladu: rychlostní konstanta kinetiky prvního nebo pseudoprvního řádu, k (d^{-1}), která ukazuje rychlost rozkladných procesů. U dávkového experimentu se k odhaduje z počáteční části rozkladové křivky získané po ukončení fáze iniciace.

▼M1

Poločas, $t_{1/2}$ (d): termín používaný pro charakteristiku rychlosti reakce prvního řádu. Je to časový interval, který odpovídá poklesu koncentrace na polovinu. Poločas a rychlostní konstanta rozkladu jsou ve vzájemném vztahu vyjádřeném rovnicí $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Poločas rozkladu, DT_{50} (d): termín používaný pro kvantifikaci výsledků zkoušek biologického rozkladu. Je to časový interval včetně fáze iniciace potřebný k dosažení 50 % biologického rozkladu.

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ): Mez detekce (LOD) je koncentrace látky, pod níž nelze totožnost látky rozlišit od analytických artefaktů. Mez kvantifikace (LOQ) je koncentrace látky, pod níž nelze koncentraci určit s přijatelnou přesností.

Rozpuštěný organický uhlík (*dissolved organic carbon*, DOC): ta část organického uhlíku ve vzorku vody, kterou nelze odstranit stanovenou fázovou separací, například odstřeďováním po dobu 15 minut při zrychlení 40 000 ms^{-2} nebo membránovou filtrací pomocí membrán s póry o průměru 0,2 μm až 0,45 μm.

Celková aktivita organického ^{14}C (*total organic* ^{14}C *activity*, TOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkem.

Aktivita rozpuštěného organického ^{14}C (*dissolved organic* ^{14}C *activity*, DOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s rozpuštěným organickým uhlíkem.

Aktivita částicového organického ^{14}C (*particulate organic* ^{14}C *activity*, POA): Celková aktivita ^{14}C spojená s částicovým organickým uhlíkem.

1.3 POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato simulační zkouška je použitelná pro netěkavé nebo slabě těkavé organické látky zkoušené při nízkých koncentracích. Při použití baněk otevřených do atmosféry (např. se zátkou z vaty) lze látky s Henryho konstantou nižší než 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (přibližně 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) považovat za prakticky netěkavé. Při použití uzavřených baněk s dostatečným volným prostorem nad látkou je možné zkoušet mírně těkavé látky (s Henryho konstantami < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ nebo < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) beze ztrát ve zkušebním systému. Při odstraňování CO_2 může dojít ke ztrátám látek značených isotopem ^{14}C, pokud nejsou přijata správná předběžná opatření. V takových situacích může být nezbytné jímat CO_2 v interním absorbéru s alkálií nebo použít externí systém pro absorpci CO_2 (přímé stanovení $^{14}CO_2$, viz dodatek 3). Pro stanovení kinetiky biologického rozkladu musí být koncentrace zkoušené látky nižší než její rozpustnost ve vodě. Je však nutné uvést, že hodnoty rozpustnosti ve vodě uváděné v literatuře mohou být významně vyšší než rozpustnost zkoušené látky v přírodních vodách. Případně lze stanovit rozpustnost zkoušených látek se zvláště špatnou rozpustností ve vodě pomocí zkušebních přírodních vod.

Tuto metodu lze použít pro simulování biologického rozkladu v povrchové vodě bez hrubých částic („pelagická zkouška“) nebo ve zkalené povrchové vodě, která by například mohla existovat v blízkosti rozhraní voda/sediment („zkouška se suspendovanými sedimenty“).

▼M1

1.4 PODSTATA ZKOUŠKY

Zkouška se provádí v dávce inkubací zkoušené látky buď pouze s povrchovou vodou („pelagická zkouška“), nebo povrchovou vodou doplněnou suspendovanými pevnými látkami/sedimenty o suché hmotnosti 0,01 až 1 g/l („zkouška se suspendovanými sedimenty“) pro simulaci vodní hmoty se suspendovanými pevnými látkami nebo resuspendovanými sedimenty. Koncentrace suspendovaných pevných látek/sedimentů v nižším rozmezí tohoto intervalu je typická pro většinu povrchových vod. Zkušební baňky se inkubují ve tmě za teploty okolí za aerobních podmínek a míchání. Pro stanovení kinetiky rozkladu je zapotřebí použít nejméně dvou odlišných koncentrací zkoušené látky. Koncentrace by se měly navzájem lišit faktorem 5 až 10 a měly by představovat očekávané rozmezí koncentrací v životním prostředí. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 100 μg/l, ale dává se přednost maximálním koncentracím nižším než 10 μg/l, aby se zajistilo, že biologický rozklad dodržuje kinetiku prvního řádu. Nejnižší koncentrace by neměla překročit 10 μg/l, ale dává se přednost nejnižším zkušebním koncentracím 1–2 μg/l nebo méně než 1 μg/l. Normálně lze odpovídající analýzy takové nízké koncentrace provést pomocí komerčně dostupných látek značených isotopem ^{14}C. Kvůli analytickým omezením je často nemožné změřit koncentraci zkoušené látky s požadovanou přesností, pokud se zkoušená látka používá v koncentraci ≤ 100 μg/l (viz bod 1.7.2 druhý odstavec). Vyšší koncentrace zkoušené látky (> 100 μg/l a někdy > 1 mg/l) lze použít pro indentifikaci a stanovení množství významnějších transformačních produktů, nebo není-li k dispozici specifická analytická metoda s nízkou mezí detekce. Jestliže se zkouší vysoké koncentrace zkoušené látky, nemusí být použití výsledků pro odhad rozkladové konstanty prvního řádu a poločasu možné, protože rozklad pravděpodobně nebude probíhat podle kinetiky prvního řádu.

Rozklad je sledován v příslušných časových intervalech měřením zbytkového ^{14}C nebo zbytkové koncentrace zkoušené látky při použití specifické chemické analýzy. Značení nejstabilnější části molekuly isotopem ^{14}C zaručuje určení celkové mineralizace, zatímco značení méně stabilní části molekuly isotopem ^{14}C společně s využitím specifické analýzy umožňuje hodnotit pouze primární biologický rozklad. Ovšem nejstabilnější část nemusí nutně obsahovat relevantní funkční část molekuly (kterou lze vztahovat ke konkrétní vlastnosti, například toxicitě, bioakumulaci atd.). V tomto případě může být vhodné použít zkoušenou látku, která je značena isotopem ^{14}C, ve funkční části ke sledování eliminace konkrétní vlastnosti.

1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

V této zkoušce lze použít jak zkoušené látky značené radioisotopy, tak látky neznačené. Doporučuje se metoda značení isotopem ^{14}C, přičemž značena by obvykle měla být nejstabilnější část (části) molekuly (viz také bod 1.4). U látek obsahujících více než jeden aromatický kruh by se isotopem ^{14}C měly nejlépe označit jeden či více uhlíků v každém kruhu. Dále by se isotopem ^{14}C měl nejlépe označit jeden či více uhlíků na obou stranách snadno rozložitelných vazeb. Chemická a/nebo radiochemická čistota zkoušené látky by měla být > 95 %. U radioisotopově značených látek se dává přednost specifické aktivitě přibližně 50 μCi/mg (1,85 MBq) nebo více, aby se usnadnila měření ^{14}C u zkoušek prováděných s nízkými počátečními koncentracemi. O zkoušené látce by měly být k dispozici následující informace:

▼M1

— rozpustnost ve vodě (metoda A.6),

— rozpustnost v organickém(ých) rozpouštědle(ch) (látky používané s rozpouštědlem nebo s nízkou rozpustností ve vodě),

— disociační konstanta (pK_a), jestliže látka podléhá protonaci nebo deprotonaci (Pokyn OECD pro zkoušení 112) (5),

— tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta,

— chemická stálost ve vodě a ve tmě (hydrolýza) (metoda C.7).

Zkouší-li se v mořské vodě látky špatně rozpustné ve vodě, může být rovněž užitečné znát vysolovací konstantu (neboli „Sečenovovu konstantu“) K^s, která je definována výrazem: log (S/S') = K^s C_m, kde S je rozpustnost látky ve sladké vodě a S' v mořské vodě, a C_m je molární koncentrace soli.

Jestliže se zkouška provádí jako „zkouška se suspendovanými sedimenty“, měly by být k dispozici rovněž následující informace:

— rozdělovací koeficient oktanol-1-ol/voda (metoda A.8),

— adsorpční koeficient (metoda C.18).

Mezi další užitečné informace patří:

— koncentrace v životním prostředí, je-li známá nebo odhadnutá,

— toxicita zkoušené látky pro mikroorganismy (metoda C.11),

— snadná a/nebo vlastní biologická rozložitelnost (metody C.4 A–F, C.12, C.9, Pokyn OECD pro zkoušení 302 (5)),

— aerobní nebo anaerobní biologická rozložitelnost v půdě a studie transformace v systémech voda/sediment (metody C.23, C.24).

1.6 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka by se měla používat látka, která se za aerobních podmínek obvykle snadno rozkládá (např. anilin nebo benzoát sodný). Očekávaný časový interval pro rozklad anilinu a benzoátu sodného je obvykle méně než 2 týdny. Účelem referenčních látek je zajistit, aby byla mikrobiální aktivita zkušební vody v určitých mezích, tj., aby voda obsahovala aktivní mikrobiální populaci.

▼M1

1.7 KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1 **Výtěžnost**

Bezprostředně po přidání zkoušené látky je třeba ověřit každou počáteční zkušební koncentraci měřením aktivity ^{14}C nebo – v případě neznačených látek – chemickými analýzami vždy nejméně v duplikátních vzorcích. Takto se získají informace o použitelnosti a opakovatelnosti analytické metody a o homogenitě distribuce zkoušené látky. V následných analýzách údajů se obvykle namísto nominální koncentrace použije spíše naměřená počáteční aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky, neboť se jejich použitím kompenzují ztráty způsobené sorpcí a chybami při dávkování. U zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se hodnota výtěžnosti na konci experimentu udává pomocí hmotnostní bilance (viz bod 1.8.9.4 poslední odstavec). V ideálním případě by se hmotnostní bilance radioisotopově značené látky měla pohybovat od 90 % do 110 %, zatímco analytická přesnost by měla vést k počáteční výtěžnosti od 70 % do 110 % pro neznačené zkoušené látky. Tato rozmezí je zapotřebí vykládat jako cíle a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky. Případně lze analytickou přesnost stanovit pro zkoušenou látku při nižší koncentraci, než je koncentrace počáteční, a pro významnější transformační produkty.

1.7.2 **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (včetně účinnosti první extrakce) pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně transformačních produktů by se měla ověřit pěti opakovanými analýzami jednotlivých extraktů povrchové vody.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být pokud možno alespoň 1 % počátečního množství použitého ve zkušebním systému. Mez kvantifikace (LOQ) by se měla rovnat nebo být menší než 10 % použité koncentrace. Chemické analýzy mnoha organických látek a jejich transformačních produktů často vyžadují, aby se zkoušená látka používala v relativně vysoké koncentraci, tj. > 100 μg/l.

1.8 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1 **Vybavení**

Zkoušku lze provádět v Erlenmeyerových baňkách nebo válcových nádobách vhodné kapacity (např. 0,5 nebo 1,0 litru) uzavřených silikonovou nebo pryžovou zátkou nebo v baňkách na sérum s víky těsnícími proti úniku CO_2 (např. opatřené septou z butylové pryže). Další možností je provádět zkoušku pomocí více baněk a používat jako vzorek celý objem vždy nejméně dvou baněk v každém intervalu odběru vzorku (viz bod 1.8.9.1 poslední odstavec). Pro netěkavé zkoušené látky, které nejsou radioisotopově označeny, nejsou nutné plynotěsné zátky nebo víka; vhodné jsou volné vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.9.1 druhý odstavec). Lehce těkavé látky by měly být zkoušeny v systému biometrického typu s jemným mícháním povrchu vody. Aby se zajistilo, že nedojde k bakteriální kontaminaci, lze nádoby před použitím případně sterilizovat ohřevem nebo autoklávováním. Dále se používá toto standardní laboratorní vybavení:

— desková třepačka nebo magnetické míchačky pro nepřetržité míchání zkušebních baněk,

▼M1

— odstředivka,

— pH-metr,

— turbidimetr pro nefelometrická měření turbidity (zákalu),

— pec nebo mikrovlnná pec pro stanovení suché hmotnosti,

— membránový filtrační přístroj,

— autokláv nebo pec pro tepelnou sterilizaci skleněného nádobí,

— zařízení pro manipulaci s látkami značenými isotopem ^{14}C,

— zařízení pro kvantifikaci aktivity ^{14}C ve vzorcích z roztoků pro s jímaným CO_2 a, bude-li to nutné, ze vzorků sedimentů,

— analytické vybavení pro určení zkoušené (a referenční) látky, jestliže se použije specifická chemická analýza (např. plynový chromatograf, chromatograf pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii).

1.8.2 **Zásobní roztoky zkoušené látky**

Pro přípravu zásobních roztoků zkoušených a referenčních látek se používá deionizovaná voda (viz bod 1.8.7 první odstavec). Deionizovaná voda by měla být zbavená látek, které mohou být toxické pro mikroorganismy a podíl rozpuštěného organického uhlíku (DOC) by neměl být vyšší než 1 mg/l (6).

1.8.3 **Odběr a přeprava povrchové vody**

Místo odběru povrchové vody by mělo být vybráno podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru míst odběru musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo domácích vstupů. Jestliže je známo, že bylo vodní prostředí v předchozích čtyřech letech kontaminováno zkoušenou látkou nebo jejími strukturními analogy, nemělo by se používat k odběru zkušební vody, s výjimkou případů, kdy je zkoumání rychlostí rozkladu v dříve exponovaných místech výslovným účelem zkoušejícího. V místě odběru by se měly změřit pH a teplota vody. Dále je třeba zaznamenat hloubku odběru a vzhled vzorku vody (např. barva a turbidita) (viz bod 3). Měly by se měřit koncentrace kyslíku a/nebo oxidačně-redukční potenciál ve vodě a v povrchové vrstvě sedimentu s cílem prokázat aerobní podmínky, s výjimkou případů, kdy je jejich existence patrná ze vzhledu a historické zkušenosti s daným místem. Povrchová voda by se měla přepravovat v důkladně vyčištěném zásobníku. Během přepravy by teplota vzorku neměla významně překračovat teplotu použitou při zkoušce. Doporučuje se chlazení na 4 °C, pokud trvání přepravy překračuje 2 až 3 hodiny. Vzorek vody se nesmí zmrazit.

▼M1

1.8.4 **Skladování a příprava povrchové vody**

Zkouška by měla být nejlépe zahájena do jednoho dne po odběru vzorku. Skladování vody, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů. Vzorek vody je zapotřebí skladovat až do použití při teplotě 4 °C za provzdušňování. Před použitím je třeba odstranit hrubé částice, např. filtrací přes nylonový filtr s velikostí ok okolo 100 μm nebo přes hrubý papírový filtr, případně sedimentací.

1.8.5 **Příprava vody doplněné sedimentem (nepovinné)**

Pro zkoušku se suspendovanými sedimenty se do baněk obsahujících přírodní vodu (přefiltrovanou za účelem odstranění hrubých částic, jak je popsáno v bodě 1.8.4) přidává povrchový sediment, aby vznikla suspenze; koncentrace suspendovaných pevných látek by měla být v rozmezí 0,01 až 1 g/l. Povrchový sediment by měl pocházet ze stejného místa, z něhož byl odebrán vzorek vody. V závislosti na konkrétním vodním prostředí může být povrchový sediment buď charakterizován vysokým obsahem organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturou, nebo nízkým obsahem organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturou (3). Povrchový sediment lze připravit následovně: odeberte několik jader sedimentu pomocí zkumavky z průhledného plastu, bezprostředně po odběru vzorku oddělte horní aerobní vrstvy (od povrchu do hloubky maximálně 5 mm) a smiste je. Výsledný vzorek sedimentu by měl být přepravován v zásobníku s velkým vzduchovým prostorem nad sedimentem, aby se sediment udržel za aerobních podmínek (chladit na 4 °C, jestliže doba přepravy překračuje 2 až 3 hodiny). Vzorek sedimentu by měl být suspendován ve zkušební vodě v poměru 1:10 a do použití skladován při teplotě 4 °C za provzdušňování. Skladování sedimentu, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů.

1.8.6 **Polospojitý postup (nepovinné)**

Jestliže nastává dlouhá fáze iniciace před tím, než je možné měřit významný rozklad zkoušené látky, může být nezbytná prodloužená inkubace (několik měsíců). Pokud je tato skutečnost z předchozího zkoušení látky známa, zkoušku lze zahájit používáním polospojitého postupu, který umožňuje pravidelné obnovování části zkušební vody nebo suspenze (viz dodatek 2). Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu (viz bod 1.8.8.3 druhý odstavec).

1.8.7 **Přidání zkoušené (nebo referenční) látky**

U látek s vysokou rozpustností ve vodě (> 1 mg/l) a nízkou těkavostí (Henryho konstanta < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ nebo < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) lze připravit zásobní roztok v deionizované vodě (viz bod 1.8.2), vhodný objem zásobního roztoku se přidává do zkušebních nádob pro dosažení požadované koncentrace. Objem jakéhokoliv přidaného zásobního roztoku je třeba omezit na co nejnižší možnou míru (< 10 % konečného objemu kapaliny, je-li to možné). Dalším postupem, který lze považovat za alternativu pro používání organických rozpouštědel, je rozpustit zkoušenou látku ve větším objemu zkušební vody.

▼M1

Je-li to nevyhnutelné, měly by se zásobní roztoky netěkavých látek se špatnou rozpustností ve vodě připravit za použití těkavého organického rozpouštědla, avšak množství rozpouštědla přidaného do zkušebního systému by nemělo překročit 1 % obj. a nemělo by mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu. Rozpouštědlo by nemělo ovlivňovat stálost zkoušené látky ve vodě. Rozpouštědlo by mělo být odstraněno na mimořádně malé množství tak, aby významně nezvyšovalo koncentraci DOC zkušební vody nebo suspenze. Toto je třeba zkontrolovat analýzou specifickou pro danou látku, nebo je-li to možné, analýzou DOC (6). Musí se vynaložit úsilí na omezení přenášeného rozpouštědla na absolutně nezbytné množství a zajistit, aby množství zkoušené látky bylo možné rozpustit v konečném objemu zkušební vody. Pro zavedení zkoušené látky do zkušebních nádob lze používat i další metody, které jsou popsané v literatuře (7) a (8). Používá-li se k aplikaci zkoušené látky organické rozpouštědlo, měly by se kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu (bez přídavků) a zkušební vodu s přidanou referenční látkou exponovat podobně jako aktivní zkušební nádoby doplněné zkoušenou látkou v nosném rozpouštědle. Cílem kontrol s rozpouštědlem je prozkoumat na základě rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky na mikrobiální populaci způsobené rozpouštědlem.

1.8.8 **Zkušební podmínky**

1.8.8.1 *Zkušební teplota*

Inkubace by měla probíhat (nejlépe) v temnu nebo v difuzním světle při kontrolované (±2 °C) teplotě, která může být teplotou terénu nebo standardní teplotou 20 až 25 °C. Teplotou terénu může být buď skutečná teplota vzorku v době odběru, nebo průměrná teplota terénu na místě odběru.

1.8.8.2 *Promíchávání*

Je nutné zajistit promíchávání nepřetržitým protřepáváním nebo mícháním, aby se částice a mikroorganismy udržovaly v suspenzi. Promíchávání rovněž umožňuje přenos kyslíku do kapaliny z volného prostoru nad kapalinou tak, aby bylo možné odpovídajícím způsobem udržovat aerobní podmínky. Umístěte baňky na deskovou třepačku (promíchávání přibližně při 100 ot/min) nebo použijte magnetické míchání. Promíchávání musí být nepřetržité. Třepání nebo míchání by však mělo být co nejjemnější, přičemž je třeba udržovat homogenní suspenzi.

1.8.8.3 *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud se nepoužije polospojitý postup s pravidelným obnovováním zkušební suspenze (viz bod 1.8.6 a dodatek 2). Ovšem doba trvání může být u dávkové zkoušky prodloužena na maximálně 90 dnů, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů. Rozklad se sleduje ve vhodných časových intervalech určováním zbytkové aktivity ^{14}C nebo uvolněného $^{14}CO_2$ (viz bod 1.8.9.4) a/nebo chemickou analýzou (bod 1.8.9.5). Doba inkubace musí být dostatečně dlouhá pro vyhodnocení procesu rozkladu. Rozsah rozkladu by měl nejlépe překročit 50 %; u pomalu rozložitelných látek musí být rozsah rozkladu dostatečný (obvykle větší než 20 % rozklad) k tomu, aby byl možný odhad kinetické rychlostní konstanty rozkladu.

▼M1

Musí se provádět pravidelná měření pH a koncentrace kyslíku ve zkušebním systému, pokud nejsou k dispozici předchozí zkušenosti z podobných zkoušek se vzorky vody a sedimentů odebraných ze stejného místa, přičemž v takovém případě by tato měření nebyla potřebná. Za určitých podmínek by mohl metabolismus primárních substrátů při mnohem vyšších koncentracích ve vodě nebo v sedimentu vést k tak velkému uvolňování CO_2, a tak značnému vyčerpání kyslíku, že by to významně změnilo experimentální podmínky během zkoušky.

1.8.9 **Postup**

1.8.9.1 *Příprava baněk pro pelagickou zkoušku*

Do zkušebních baněk se převede vhodný objem zkušební vody, a to až do přibližně jedné třetiny objemu baňky a ne méně než přibližně 100 ml. Jestliže se používá více baněk (umožňujících zkoušení na celém objemu baňky v každém čase odběru vzorku), je vhodný objem zkušební vody rovněž přibližně 100 ml, protože malé objemy vzorku mohou ovlivnit délku fáze iniciace. Zkoušená látka se přidá ze zásobního roztoku, jak je popsáno v bodech 1.8.2 a 1.8.7. Pro určení kinetiky rozkladu a výpočet kinetické rychlostní konstanty rozkladu by se měly použít nejméně dvě odlišné koncentrace zkoušené látky lišící se faktorem 5 až 10. Obě zvolené koncentrace by měly být nižší než 100 μg/l a nejlépe v rozmezí < 1–10 μg/l.

Baňky se uzavřou zátkami nebo víčky nepropustnými pro vzduch a CO_2. U netěkavých zkušebních chemických látek neznačených isotopem ^{14}C jsou vhodné volné vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.1), pokud je ovšem o všech hlavních produktech rozkladu známo, že jsou netěkavé, a pokud se používá nepřímé stanovení CO_2 (viz dodatek 3).

Baňky se inkubují při zvolené teplotě (viz bod 1.8.8.1). Vzorky pro chemickou analýzu nebo měření ^{14}C je třeba odebrat na počátku zkoušky (tj. předtím, než začne biologický rozklad; viz bod 1.7.1) a poté ve vhodných časových intervalech v průběhu zkoušky. Odběr vzorků lze provádět odběrem dílčích vzorků (např. 5 ml alikvotních objemů) z každého opakování nebo odběrem vždy celého objemu baňky v každém čase odběru vzorku. Mineralizace zkoušené látky může být určena buď přímo, nebo nepřímo (viz dodatek 3). Obvykle se vyžaduje minimálně pět bodů pro odběr vzorku během fáze rozkladu (tj. po ukončené fázi iniciace) s cílem odhadnout spolehlivou rychlostní konstantu, s výjimkou případů, kdy je možné odůvodnit, že u rychle rozložitelných látek jsou dostatečné tři body odběru vzorku. U látek, které nepodléhají rychlému rozkladu, lze snadno provést více měření během fáze rozkladu, a proto by se k odhadu *k* mělo používat více datových bodů. Pro odběr vzorků nelze uvést žádný pevný časový harmonogram, protože rychlost biologického rozkladu se v jednotlivých případech liší; ovšem doporučuje se odebírat vzorky jednou týdně, pokud je rozklad pomalý. Jestliže zkoušená látka podléhá rychlému rozkladu, odběr vzorků by se měl během prvních tří dnů provádět jednou denně a poté každý druhý nebo třetí den. Za určitých okolností, například u velmi rychle hydrolyzujících látek, může být nezbytné odebírat vzorky v hodinových intervalech. Doporučuje se, aby se před zkouškou provedla předběžná studie s cílem určit vhodné intervaly odběru vzorků. Pokud musí být vzorky k dispozici pro další specifickou analýzu, je užitečné odebrat více vzorků a poté na konci experimentu zvolit ty, které se mají analyzovat, v opačném pořadí, tj. poslední vzorky se analyzují první (viz bod 1.8.9.5 druhý odstavec, kde jsou pokyny ke stálosti vzorků během skladování).

▼M1

1.8.9.2 *Počet baněk a vzorků*

Nasaďte dostatečný počet zkušebních baněk v tomto rozsahu:

— zkušební baňky; nejméně dvojí baňky pro každou koncentraci zkoušené látky (nejlépe minimálně 3) nebo více zkušebních baněk pro každou koncentraci, jestliže se jako vzorek použije vždy celý objem baňky v každém čase odběru vzorků (označeno symbolem F_T),

— zkušební baňky pro výpočet hmotnostní bilance; nejméně dvojí baňky pro každou zkušební koncentraci (označeno symbolem F_M),

— slepé zkoušky, bez zkoušené látky; nejméně jedna zkušební baňka pro slepou zkoušku obsahující pouze zkušební vodu (označeno symbolem F_B),

— referenční kontrola; dvojí baňky s referenční látkou (např. anilinem nebo benzoátem sodným v koncentraci 10 µg/l) (označeno symbolem F_C). Cílem referenční kontroly je potvrdit minimum mikrobiální aktivity. Je-li to výhodné, lze použít radioisotopově značenou referenční látku, a to i tehdy, je-li rozklad zkoušené látky sledován chemickými analýzami,

— sterilní kontrola; jedna nebo dvě baňky obsahující sterilizovanou zkušební vodu ke zkoumání možného abiotického rozkladu nebo jiného nebiologického odstranění zkoušené látky (označeno symbolem F_S). Biologickou aktivitu lze zastavit autoklávováním (121 °C, 20 minut) zkušební vody nebo přidáním toxické látky (např. azidu sodného (NaN_3) v množství 10–20 g/l, chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) v množství 100 mg/l nebo formalinu v množství 100 mg/l) nebo zářením gama. Použije-li se $HgCl_2$, měl by se zneškodnit jako toxický odpad. U vody s velkým množstvím přidaného sedimentu se sterilních podmínek dosahuje nesnadno; v tomto případě se doporučuje opakované autoklávování (např. třikrát). Je třeba vzít v úvahu, že sorpční charakteristiky sedimentu se mohou autoklávováním pozměnit,

— kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu a zkušební vodu s referenční látkou; dvojí baňky ošetřené stejným množství rozpouštědla a podrobené stejnému postupu jako v případě aplikace zkoušené látky. Cílem je zkoumat pomocí určení rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky rozpouštědla.

V plánu zkoušky by měl zkoušející vzít v úvahu relativní důležitost většího počtu opakování oproti zvýšenému počtu časů odběru vzorků. Přesný počet požadovaných baněk bude záviset na metodě použité pro měření rozkladu (viz bod 1.8.9.1 třetí odstavec, bod 1.8.9.4 a dodatek 3).

▼M1

V každém čase odběru vzorku by se měly odebrat dva dílčí vzorky (např. 5 ml alikvotních objemů) z každé zkušební baňky. Jestliže se používá více baněk, aby bylo možné použít jako vzorek vždy celý objem baňky, v každém čase odběru vzorků by se měly odebrat minimálně dvě baňky (viz bod 1.8.9.1 první odstavec).

1.8.9.3 *Příprava baněk pro zkoušku se suspendovanými sedimenty [nepovinné]*

Přidejte do zkušebních nádob potřebná množství zkušební vody a případně sedimentu (viz bod 1.8.5). Příprava baněk pro zkoušku se suspendovanými sedimenty je stejná jako pro pelagickou zkoušku (viz body 1.8.9.1 a 1.8.9.2). Nejlépe použijte lahvičky na sérum nebo baňky podobných tvarů. Umístěte uzavřené baňky horizontálně do třepačky. Je zřejmé, že otevřené baňky pro netěkavé látky neznačené isotopem ^{14}C by se měly umístit do svislé polohy; v tomto případě se doporučuje magnetické míchání a používání magnetických tyčinek pokrytých sklem. Je-li to nezbytné, přivádějte do lahví vzduch, aby se udržely správné aerobní podmínky.

1.8.9.4 *Radiochemická stanovení*

Uvolněný $^{14}CO_2$ se měří nepřímo a přímo (viz dodatek 3). Nepřímo se $^{14}CO_2$ určuje jako rozdíl mezi počáteční aktivitou ^{14}C ve zkušební vodě nebo suspenzi a celkovou zbytkovou aktivitou v době odběru vzorku po okyselení vzorku na pH 2–3 a odvedení CO_2. Odstraní se tak anorganický uhlík a naměřená zbytková aktivita se odvodí z organického materiálu. Nepřímé stanovení $^{14}CO_2$ by se nemělo používat, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty (viz dodatek 3). Je-li to možné, uvolňování $^{14}CO_2$ by se mělo měřit přímo (viz dodatek 3) v každém čase odběru vzorků v nejméně jedné zkušební baňce; tento postup umožňuje kontrolovat jak hmotnostní bilanci, tak proces biologického rozkladu, ale je omezen na zkoušky prováděné s uzavřenými baňkami.

Jestliže je uvolněný $^{14}CO_2$ během zkoušky měřen přímo, vyčlení se pro tento účel na počátku zkoušky více baněk. Přímé stanovení $^{14}CO_2$ se doporučuje tehdy, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty. V každém bodě měření se dodatečné zkušební baňky okyselí na pH 2 až 3 a $^{14}CO_2$ se jímá v interním či externím absorbéru (viz dodatek 3).

Případně lze koncentrace zkoušené látky značené isotopem ^{14}C a významnějších transformačních produktů stanovit radiochromatograficky (např. chromatografií na tenké vrstvě, RAD-TLC) nebo pomocí HPLC s radiochemickou detekcí.

Případně lze určit fázovou distribuci zbývající radioaktivity (viz dodatek 1) a zbytkovou zkoušenou látku a transformační produkty.

▼M1

Na konci zkoušky by se měla určit hmotnostní bilance, a to přímým měřením $^{14}CO_2$ pomocí samostatných zkušebních baněk, z nichž se v průběhu zkoušky neodebírají žádné vzorky (viz dodatek 3).

1.8.9.5 *Specifická chemická analýza*

Jestliže je k dispozici citlivá specifická analytická metoda, lze primární biologický rozklad hodnotit měřením celkové zbytkové koncentrace zkoušené látky namísto využívání metod značení radioisotopem. Jestliže se použije zkoušená látka značená radioisotopem (pro měření celkové mineralizace), lze souběžně provádět specifické chemické analýzy s cílem získat užitečné dodatečné informace a ověřit postup. Specifické chemické analýzy lze rovněž použít pro měření transformačních produktů vzniklých během rozkladu zkoušené látky, přičemž se toto doporučuje u látek, které jsou mineralizovány s poločasy překračujícími 60 dnů. Měla by se změřit a v protokolu o zkoušce uvést koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů v každém čase odběru vzorků (jako koncentrace a jako procentuální podíl použité koncentrace). Obecně je zapotřebí identifikovat transformační produkty zjištěné při ≥ 10 % použité koncentrace v jakoukoliv dobu odběru vzorku; v opačném případě je nutné přiměřeně odůvodnit, proč nebyly identifikovány. Transformační produkty, jejichž koncentrace během studie trvale rostou, by rovněž měly být určeny, a to i tehdy, pokud jejich koncentrace nepřekračuje shora uvedenou mez, neboť tyto transformační produkty mohou být známkou perzistentnosti. Analýzy transformačních produktů ve sterilních kontrolách by se měly vzít v potaz v případě, že se rychlá abiotická přeměna zkoušené látky (např. hydrolýza) považuje za možnou. Potřeba kvantitativního stanovení a identifikace transformačních produktů by se měla posuzovat případ od případu a odůvodnění by měla být uvedena v protokolu o zkoušce. Extrakční postupy s organickými rozpouštědly by se měly používat podle pokynů uvedených v příslušném analytickém postupu.

Všechny vzorky by se měly skladovat vzduchotěsně při teplotách od 2 do 4 °C, pokud se analýza provádí do 24 hodin (nejlépe). Při delším skladování je zapotřebí vzorky zmrazovat na teplotu nižší než –18 °C nebo je chemicky konzervovat. Okyselení jako metoda pro konzervaci vzorků se nedoporučuje, protože okyselené vzorky mohou být nestálé. Jestliže se vzorky neanalyzují do 24 hodin a jsou-li skladovány po delší dobu, je zapotřebí provést studii stability při skladování, aby se prokázala stálost dotčených chemických látek při teplotách skladování nižších než –18 °C nebo při konzervaci. Jestliže analytická metoda vyžaduje extrakci rozpouštědla nebo extrakci tuhé fáze (SPE), je třeba provést tuto extrakci bezprostředně po odběru vzorků nebo po skladování vzorku v chlazeném stavu po dobu maximálně 24 hodin.

V závislosti na citlivosti analytické metody mohou být nezbytné větší objemy vzorků než objemy uvedené v bodě 1.8.1. Zkoušku lze snadno provést při zkušebních objemech jeden litr v baňkách o objemu 2 až 3 litry, což umožňuje odebírat vzorky o objemu přibližně 100 ml.

▼M1

2. **DATA A ZPRÁVY**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

2.1.1 **Vynášení dat**

Časy odběru vzorku se zaokrouhlí na celé hodiny (s výjimkou případů, kdy se látka významně rozkládá v řádu minut až hodin), ne však na celé dny. Odhady zbytkové aktivity zkoušené látky (pro látky značené isotopem ^{14}C) nebo zbytkové koncentrace (pro neznačené látky) se vynesou proti času jak v lineárním, tak v semilogaritmickém tvaru (viz obrázky 1a a 1b). Jestliže došlo k rozkladu, výsledky z baněk F_T je třeba porovnat s výsledky z baněk F_S. Jestliže se střední hodnoty výsledků z baněk se zkoušenou látkou (F_T) a sterilních baněk (F_S) odchylují o méně než 10 %, lze předpokládat, že pozorovaný rozklad je převážně abiotický. Jestliže je rozklad v baňkách F_S nižší, lze hodnoty použít pro korekci hodnot získaných pomocí baněk F_T (odečtením), odhadnout tak rozsah biologického rozkladu. Provádí-li se nepovinné analýzy významnějších transformačních produktů, je zapotřebí získat kromě grafického znázornění úbytku zkoušené látky také grafické znázornění jejich tvorby a úbytku.

Trvání fáze iniciace t_L se odhadne z křivky rozkladu (semilogaritmický graf) extrapolací její lineární části na nulový rozklad nebo případně určením doby přibližně 10 % rozkladu (viz obrázky 1a a 1b). Ze semilogaritmického grafu se odhadne rychlostní konstanta prvního řádu, k, a její standardní chyba lineární regresí ln (zbytková aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky) ve vztahu k času. Zejména při měřeních ^{14}C je nutné používat pouze údaje patřící do počáteční lineární části křivky po ukončení fáze iniciace a dávat přednost výběru spíše malého počtu reprezentativních údajů před výběrem velkého počtu více nejistých dat. Nejistota zde zahrnuje chyby vlastní doporučenému přímému použití naměřených zbytkových aktivit ^{14}C (viz dále). Někdy může být důležité vypočítat dvě odlišné rychlostní konstanty, pokud rozklad postupuje ve dvou fázích. Za tímto účelem se definují dvě odlišné fáze rozkladové křivky. Rychlostní konstanta, k, a poločas, $t_{½} = \ln 2/k$, by se měly vypočítat pro každou z jednotlivých baněk k opakování, pokud se odebírají dílčí vzorky ze stejné baňky, nebo pomocí průměrných hodnot, pokud se použije jako vzorek celý objem baňky v každé době odběru vzorku (viz bod 1.8.9.2 poslední odstavec). Použije-li se první uvedený postup, je třeba v protokolu o zkoušce uvést rychlostní konstantu a poločas pro každou z jednotlivých baněk k opakování a vyjádřit je rovněž jako průměrnou hodnotu se standardní chybou. Jestliže se používaly vysoké koncentrace zkoušené látky, křivka rozkladu se může značně odchylovat od přímky (semilogaritmický graf) a kinetika prvního řádu nemusí platit. Definování poločasu proto nemá žádným smysl. Ovšem při omezeném rozpětí dat lze použít kinetiku pseudoprvního řádu a poločas rozkladu DT_{50} (čas pro dosažení 50 % rozkladu) odhadnout. Je však třeba mít na paměti, že časový průběh rozkladu nad zvolené datové rozpětí nelze předpovídat pomocí parametru DT_{50}, který slouží pouze k popisu dané datové množiny. Analytické nástroje pro usnadnění statistických výpočtů a sestavení křivky jsou snadno dostupné a doporučuje se používat software tohoto typu.

▼M1

Jestliže se provádí specifické chemické analýzy, je třeba odhadnout rychlostní konstanty a poločasy primárního rozkladu, jak je shora uvedeno pro celkovou mineralizaci. Jestliže je limitujícím procesem primární rozklad, lze někdy použít datové body z celého průběhu rozkladu. Je to proto, že měření jsou přímá, na rozdíl od měření aktivity ^{14}C.

Jestliže se použijí látky značené isotopem ^{14}C, hmotnostní bilance by měla být vyjádřena v procentech použité počáteční koncentrace nejméně na konci zkoušky.

2.1.2 **Zbytková aktivita**

Při biologickém rozkladu té části organické látky, která je značená isotopem ^{14}C, se hlavní část ^{14}C přemění na $^{14}CO_2$, zatímco další část se využije pro růst biomasy a/nebo syntézu mimobuněčných metabolitů. Proto zcela „úplný“ biologický rozklad látky nedává 100 % přeměnu jejího uhlíku na $^{14}CO_2$. Isotop ^{14}C zabudovaný do produktů vytvářených biologickou syntézou se následně v důsledku „sekundární mineralizace“ pomalu uvolňuje jako $^{14}CO_2$. Z těchto důvodů vykazují grafy zbytkové aktivity organického ^{14}C (měřeno po odstranění CO_2) nebo vzniklého $^{14}CO_2$ v závislosti na čase i po dokončení rozkladu „chvostování“. Tím se komplikuje kinetická interpretace dat, a proto je k odhadu rychlostní konstanty rozkladu zapotřebí obvykle používat pouze počáteční část křivky (po skončení fáze iniciace a před dosažením přibližně 50 % rozkladu). Při rozkladu zkoušené látky je celková zbytková aktivita organického ^{14}C vždy vyšší než aktivita ^{14}C spojená se zbývající nedotčenou zkoušenou látkou. Jestliže se zkoušená látka rozkládá reakcí prvního řádu a konstantní frakce α se mineralizuje na CO_2, počáteční sklon křivky úbytku ^{14}C (celkový organický ^{14}C vzhledem k času) bude α-násobkem sklonu příslušné křivky koncentrace zkoušené látky (nebo přesněji řečeno té části zkoušené látky, která je značená isotopem ^{14}C). Při použití nekorigovaného měření celkové aktivity organického ^{14}C bude proto vypočítaná rychlostní konstanta rozkladu konzervativní. V literatuře (2) (9) (10) (11) byly popsány postupy pro odhad koncentrací zkoušené látky z naměřených radiochemických aktivit na základě různých zjednodušujících předpokladů. Takové postupy se nejsnáze používají u rychle rozložitelných látek.

2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Jestliže se zjistí, že k nezávisí na rostoucí koncentraci (tj. pokud je vypočítaná konstanta k přibližně stejná při různých koncentracích zkoušené látky), lze předpokládat, že rychlostní konstanta prvního řádu je reprezentativní pro použité zkušební podmínky, tj. pro zkoušenou látku, vzorek vody a zkušební teplotu. Odborníci musí vyhodnotit, do jaké míry lze výsledky generalizovat či extrapolovat na jiné systémy. Jestliže se zkoušená látka použije ve vysoké koncentraci, a rozklad proto neprobíhá podle kinetiky prvního řádu, nelze data použít pro přímý odhad rychlostní konstanty prvního řádu nebo odpovídajícího poločasu. Ovšem data odvozená ze zkoušky s vysokou koncentrací zkoušené látky mohou být přesto použitelná pro odhad stupně celkové mineralizace a/nebo pro detekci a kvantifikaci transformačních produktů.

▼M1

Jestliže jsou známy rychlosti jiných ztrátových procesů než biologického rozkladu (například hydrolýza nebo těkání), mohou být odečteny od čisté ztrátové rychlosti pozorované během zkoušky, čímž se získá přibližný odhad rychlosti biologického rozkladu. Údaje o hydrolýze mohou být například získány ze sterilní kontroly nebo ze souběžného zkoušení pomocí vyšší koncentrace zkoušené látky.

Nepřímé a přímé stanovení $^{14}CO_2$ (bod 1.8.9.4 a dodatek 3) lze použít pouze pro měření rozsahu mineralizace zkoušené látky na CO_2. K analýze koncentrací zkoušené látky značené isotopem ^{14}C a tvorby významnějších transformačních produktů lze použít radiochromatografii (RAD-TLC) nebo HPLC (bod 1.8.9.4 třetí odstavec). Aby byl možný přímý odhad poločasu, je nezbytné, aby nebyly přítomny žádné významnější transformační produkty (definované jako ≥ 10 % použitého množství zkoušené látky). Jestliže jsou přítomny významnější transformační produkty odpovídající této definici, požaduje se podrobné hodnocení dat. To může zahrnovat opakované zkoušení a/nebo identifikaci transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavec), pokud nelze osud transformačních produktů přiměřeně vyhodnotit na základě zkušenosti (např. informace o cestě rozkladu). Protože se poměr uhlíku zkoušené látky přeměněného na CO_2 mění (do velké míry závisí na koncentraci zkoušené látky a dalších dostupných substrátech, na zkušebních podmínkách a mikrobiálním společenství), tato zkouška nedovoluje přímý odhad úplného biologického rozkladu, jako tomu je u zkoušky na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC); výsledek je však podobný výsledku získanému zkouškou respirometrií. Stupeň mineralizace tak bude rovný minimální úrovni úplného biologického rozkladu nebo bude nižší. Pro získání ucelenějšího obrazu úplného biologického rozkladu (mineralizace a zabudování do biomasy) by se měla analýza fázové distribuce ^{14}C provádět na konci zkoušky (viz dodatek 1). ^{14}C obsažený v souboru částic bude obsahovat ^{14}C zabudovaný do bakteriální biomasy a ^{14}C sorbovaný do organických částic.

2.3 VALIDITA ZKOUŠKY

Jestliže se referenční látka nerozloží během očekávaného časového intervalu (u anilinu a benzoátu sodného je to obvykle méně než dva týdny), validita zkoušky je zpochybněna a musí být dále ověřena, případně by se zkouška měla opakovat s novým vzorkem vody. V kroužkové zkoušce této metody pořádané ISO, které se účastnilo sedm laboratoří z celé Evropy, se upravené rychlostní konstanty rozkladu pro anilin pohybovaly od 0,3 do 1,7 dne^{-1} s průměrem 0,8 d^{-1} při teplotě 20 °C a standardní chybě ±0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dne). Typické fáze iniciace trvaly 1 až 7 dnů. Ve zkoumaných vodách byla uváděna bakteriální biomasa odpovídající 10^3 až 10^4 jednotek tvořících kolonie (CFU) na ml. Rychlosti rozkladu ve středoevropských vodách bohatých na živiny byly vyšší než ve skandinávských oligotrofních vodách, což může být způsobeno odlišným trofickým stavem nebo expozicí chemickým látkám.

Celková výtěžnost (hmotnostní bilance) na konci experimentu by měl být v rozmezí 90 % až 110 % pro radioisotopově značené látky, zatímco počáteční výtěžnost na počátku experimentu by se měla pohybovat v rozmezí 70 % až 110 % pro neznačené látky. Ovšem tato rozmezí je zapotřebí vykládat pouze jako cílová a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky.

▼M1

3. **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

V protokolu o zkoušce, který bude rovněž obsahovat nejméně následující informace, musí být jasně uveden typ studie, tj. pelagická nebo zkouška se suspendovanými sedimenty:

Zkoušená látka a referenční látka(y):

— obecné názvy, chemické názvy (doporučují se názvy podle IUPAC a/nebo CAS), čísla CAS, strukturní vzorce (uvádějící polohu ^{14}C, pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené a referenční látky (viz body 1.5 a 1.6),

— chemické názvy, čísla CAS, strukturní vzorce (uvádějící polohu ^{14}C, pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti látek použitých jako standardy k identifikaci a kvantifikaci transformačních produktů,

— čistota zkoušené a referenční látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Povrchová voda:

O vzorku vody musí být poskytnuty tyto minimální informace:

— lokalita a popis místa odběru vzorku, pokud možno včetně dřívější kontaminace,

— datum a čas odběru vzorku,

— živiny (celkový obsah N, amonia, dusitanů, dusičnanů, celkový fosfor, rozpuštěný orthofosforečnan),

— hloubka odběru,

— vzhled vzorku (např. barva a turbidita),

— DOC a TOC,

— BOD,

— teplota a pH v místě a době odběru,

— kyslík nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky),

— slanost nebo vodivost (v případě mořské vody a brakické vody),

— suspendované pevné látky (v případě zakaleného vzorku),

— podle možnosti další významné informace o lokalitě odběru vzorku v době jeho odběru (např. aktuální či dřívější údaje o průtoku řek nebo mořských proudech v blízkosti hlavních výpustí a typ výpustí, meteorologické podmínky předcházející době odběru vzorku),

a nepovinně:

— mikrobiální biomasa (např. AODC (přímé počítání za použití akridinové oranže) nebo jednotky tvořící kolonie),

▼M1

— anorganický uhlík,

— koncentrace chlorofylu *a* jakožto specifický odhad biomasy řas.

Dále by se měly poskytovat následující informace o sedimentu, pokud se provádí zkouška se suspendovanými sedimenty:

— hloubka odběru sedimentu,

— vzhled sedimentu (například barevný, blátivý, bahnitý nebo písečný),

— struktura (např. % hrubého písku, jemného písku, bahna a jílu),

— suchá hmotnost v g/l suspendovaných pevných látek, koncentrace TOC nebo hmotnostní ztráta při vznícení jako měřítko obsahu organické hmoty,

— pH,

— kyslíkový nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky).

Zkušební podmínky:

— zpoždění mezi odběrem a použitím v laboratorní zkoušce, skladování vzorků a předúprava vzorku, data provádění studií,

— množství použité zkoušené látky, zkušební koncentrace a referenční látka,

— metoda aplikace zkoušené látky včetně použití rozpouštědel,

— objem použité povrchové vody a sedimentu (používá-li se) a objem vzorků odebraných v každém intervalu pro analýzu,

— popis použitého zkušebního systému,

jestliže zkouška nemusí být prováděna v temnu, informace o podmínkách „difuzního světla“,

— informace o použité metodě nebo metodách k vytvoření sterilních kontrol (např. teplota, čas a počet autoklávování),

— inkubační teplota,

— informace o analytických technikách a metodě nebo metodách použitých pro radiochemická měření a pro kontrolu hmotnostní bilance a měření fázové distribuce (provádí-li se),

— počet opakování.

Výsledky:

— výtěžnost v procentech (viz bod 1.7.1),

— opakovatelnost a citlivost používaných analytických metod včetně meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) (viz bod 1.7.2),

▼M1

— všechna naměřená data (včetně časových bodů odběru vzorků) a vypočítané hodnoty v tabulkové formě a křivky rozkladu; pro každou zkušební koncentraci a pro každou baňku k opakování je nutné v protokolu o zkoušce uvést lineární korelační koeficient pro sklon logaritmického grafu, odhadovanou fázi iniciace a rychlostní konstantu prvního řádu nebo pseudoprvního řádu (je-li to možné) a odpovídající poločas rozkladu (nebo doba poločasu t_{50}),

— v protokolu o zkoušce zaznamenejte relevantní hodnoty jako průměry výsledků zjištěných u jednotlivých opakování, např. délka fáze iniciace, rychlostní konstanta rozkladu a poločas rozkladu (nebo t_{50}),

— na základě vzhledu křivky rozkladu a možného vlivu zkušební koncentrace je třeba systém kategorizovat buď jako nepřizpůsobený, nebo přizpůsobený,

— výsledky kontroly konečné hmotnostní bilance a výsledky měření pro stanovení fázových distribucí (jsou-li k dispozici),

— podíl mineralizovaného ^{14}C, a použijí-li se specifické analýzy, konečná úroveň primárního rozkladu,

— případně identifikace, molární koncentrace a procentuální podíl aplikovaných významnějších transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavec),

— případně navrhovaná cesta transformace,

— diskuse výsledků.

4. **LITERATURA**

(1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

(2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

(3) Zkušební metoda C.23 Aerobní a anaerobní transformace v půdě.

(4) Zkušební metoda C.24 Aerobní a anaerobní transformace v systémech voda/sediment.

(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

(6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

(7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(8) OECD, předloha (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (předpokládané zveřejnění v létě roku 2000).

▼**M1**

(9) Simkins, S., Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol*. 47, 394–401.

(10) Ingerslev, F., Nyholm, N. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 45, 274–283.

(11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Dodatek 1

Fázová distribuce ^{14}C

Pro kontrolu postupu je zapotřebí doplnit rutinní měření zbytkové celkové aktivity organického ^{14}C (TOA) měřeními hmotnostní bilance zahrnující přímé stanovení uvolněného $^{14}CO_2$ po jímání v absorbéru (viz dodatek 3). Sama o sobě je pozitivní tvorba $^{14}CO_2$ přímým důkazem o biologickém rozkladu, na rozdíl od abiotického rozkladu nebo jiných ztrátových mechanismů, jakými jsou těkání a sorpce. Dodatečné užitečné informace charakterizující chování při biologické rozložitelnosti lze získat z měření distribuce TOA mezi rozpuštěným stavem (aktivita rozpuštěného organického ^{14}C, DOA) a částicovým stavem (aktivita částicového organického ^{14}C, POA) po separaci částic membránovou filtrací nebo odstřeďováním. POA obsahuje zkoušenou látku sorbovanou na mikrobiální biomasu a na další částice a dále z uhlíku zkoušené látky, který byl použit k syntéze nového buněčného materiálu, a tím začleněn do frakce částicové biomasy. Tvorbu rozpuštěného organického materiálu s ^{14}C lze odhadnout jako DOA na konci biologického rozkladu (plató na křivce závislosti rozkladu na čase).

Fázová distribuce zbytkového ^{14}C ve zvolených vzorcích se odhadne filtrováním vzorků na membránovém filtru s velikostí pórů 0,22 μm nebo 0,45 μm a z materiálu, který neabsorbuje významná množství zkoušené látky (vhodné mohou být polykarbonátové filtry). Jestliže sorpce zkoušené látky na filtr není zanedbatelně nízká (tuto skutečnost je nutné ověřit před experimentem), lze použít místo filtrace vysokorychlostní odstřeďování (2 000 g, 10 minut).

Dále je třeba s filtrátem či centrifugátem pracovat tak, jak je uvedeno v dodatku 3 pro nefiltrované vzorky. Membránové filtry se rozpustí ve vhodné scintilační kapalině a počítá se jako obvykle, obecně pouze za použití metody externího standardního poměru pro korekci na zhášení, nebo se použije oxidační činidlo na vzorek. Pokud bylo použito odstřeďování, vytvořené pelety částicové frakce se resuspendují v 1–2 ml destilované vody a převedou se do scintilační lahvičky. Následně se provedou dvě promytí pomocí 1 ml destilované vody a promývací voda se převede do lahvičky. V případě potřeby lze suspenzi ukotvit do gelu za účelem počítání scintilací v roztoku.

▼M1

Dodatek 2

Polospojitý postup

Pro dosažení významného rozkladu obtížně rozložitelných látek může být vyžadována prodloužená inkubace až po několik měsíců. Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud nebudou zachovány charakteristiky původního vzorku vody obnovením zkušební suspenze. Ovšem doba trvání zkoušky může být prodloužena na maximálně 90 dnů bez obnovení zkušební suspenze, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů.

Během inkubace po dlouhá období může být různorodost mikrobiální komunity snížena v důsledku různých ztrátových mechanismů a možného vyčerpání významných živin a primárních uhlíkových substrátů ze vzorku vody. Proto se doporučuje, aby se pro adekvátní určení rychlosti rozkladu pomalu se rozkládajících látek používala polospojitá zkouška. Zkouška by se měla zahájit použitím polospojitého postupu, pokud se na základě předchozí zkušenosti očekává, že pro dosažení 20 % rozkladu látky je nezbytná inkubační doba tří měsíců. Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu. Polospojitý postup lze zastavit a ve zkoušce pokračovat jakožto v dávkovém experimentu, když je zaznamenán významný rozklad (např. > 20 %).

Při polospojité zkoušce se každé dva týdny nahrazuje přibližně jedna třetina objemu zkušební suspenze čerstvě odebranou vodou, do níž byla přidána zkoušená látka v počáteční koncentraci. Podobně se do vody, která má být použita k obnovení, přidá sediment v počáteční koncentraci (mezi 0,01 a 1 g/l), pokud se provádí nepovinná zkouška se suspendovanými sedimenty. Při provádění zkoušky se suspendovanými částicemi sedimentu je důležité, aby byl plně suspendovaný systém zachován také během obnovování vody a aby doba zdržení byla shodná pro pevné látky a vodu, protože jinak se může ztratit zamýšlená podobnost s homogenním vodným systémem bez zakotvených fází. Z těchto důvodů se při použití polospojitého postupu dává přednost počáteční koncentraci suspendovaných sedimentů s nižším rozpětím stanoveného intervalu.

U předepsaného přídavku zkoušené látky se předpokládá, že počáteční koncentrace zkoušené látky není překročena částečným obnovením zkušební suspenze, a proto se zabrání přizpůsobení, které je často pozorováno při vysokých koncentracích zkoušených látek. Protože postup obsahuje opakovanou inokulaci i náhradu vyčerpaných živin a primárních substrátů, obnoví se původní mikrobiální různorodost a dobu trvání zkoušky lze v zásadě prodloužit do nekonečna. Při použití polospojitého postupu je důležité mít na paměti, že zbytková koncentrace zkoušené látky se musí korigovat na množství zkoušené látky přidané a odstraněné v každém postupu obnovení. U sloučenin, které se málo sorbují, lze celkovou koncentraci a koncentraci rozpuštěné zkoušené látky používat zaměnitelně. Sorpce je za stanovených podmínek (0,1–1 g pevných látek/l) pro látky s log $K_{o/v}$ < 3 (platí pro neutrální, lipofilní sloučeniny) nevýznamná (< 5 %). To je ilustrováno následujícím příkladem výpočtu. 0,1 g/l pevných látek zhruba odpovídá 10 mg uhlíku na litr (uhlíková frakce, f_C = 0,01). Předpokládejme, že:

Log $K_{o/v}$ (zkoušené látky) = 3

$K_{ou} = 0{,}42 \times K_{o/v}$

Rozdělovací koeficient $K_d = f_C \times K_{ou}$

rozpuštěná frakce celkové koncentrace (*C*-voda(C_v)/*C*-celkové(C_c) je pak:

$C_v/C_c = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatek 3

Stanovení $^{14}co_2$

Nepřímé stanovení $^{14}CO_2$

Pro rutinní měření je nepřímá metoda obvykle nejméně časově náročnou a nejpřesnější metodou, pokud je zkoušená látka netěkavá a netransformuje se na těkavé transformační produkty. Nefiltrované vzorky, např. o objemu 5 ml, se jednoduše převedou do scintilačních lahviček. Vhodná aktivita ve vzorcích je na počátku 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) a minimální počáteční aktivita je přibližně 1 000 dpm. CO_2 by měl být odstraněn po okyselení na pH 2 až 3 pomocí 1 či 2 kapek koncentrované H_3PO_4 nebo HCl. Odstraňování CO_2 lze provádět probubláváním vzduchem přibližně po ½–1 hodinu. Eventuálně lze lahvičky intenzivně protřepávat po dobu 1 až 2 hodin (například na třepačce s mikrodeskou) nebo jemně protřepávat přes noc. Účinnost procesu odstraňování CO_2 se musí zkontrolovat (prodloužením doby provzdušňování nebo protřepávání). Poté by se měla přidat scintilační kapalina vhodná pro počítání vodných vzorků, vzorek by se měl homogenizovat vířivou míchačkou a radioaktivita určit počítáním scintilací v roztoku, přičemž je nutné odečíst aktivitu pozadí zjištěnou ve slepých zkouškách (F_B). Pokud nebude zkušební voda velmi zabarvená ani nebude obsahovat vysokou koncentraci částic, vzorky budou obvykle vykazovat jednotné zhášení a postačí provedení korekcí na zhášení pomocí externího standardu. Je-li zkušební voda vysoce zbarvená, může být nutná korekce na zhášení přidáním interního standardu. Je-li koncentrace částic vysoká, nemusí být možné získat homogenní roztok či gel, případně může být odchylka zhášení mezi vzorky velká. V takovém případě lze použít níže popsanou metodu počítání pro zkušební suspenze. Provádí-li se zkouška jako zkouška se suspendovanými sedimenty, měření $^{14}CO_2$ by se mohlo provádět nepřímo odběrem homogenního 10ml vzorku zkušební vody/suspenze a oddělením fází pomocí odstřeďování při vhodných otáčkách (např. při 40 000 m/s^2 po dobu 15 minut). Vodní fáze by poté měla být ošetřena shora popsaným postupem. Aktivita ^{14}C v částicové fázi (POA) by se měla určit resuspendací sedimentu v malém objemu destilované vody, převedením do scintilačních lahviček a přidáním scintilační kapaliny pro vytvoření gelu (za tímto účelem jsou k dispozici speciální scintilační kapaliny). V závislosti na povaze částic (např. jejich obsahu organického materiálu) může být před přidáním scintilační kapaliny vzorek přes noc vyluhován tkáňovým rozpustidlem a poté homogenizován vířivou míchačkou. Alternativně lze POA určit spalováním v nadbytku kyslíku použitím oxidačního činidla na vzorek. Při počítání je třeba vždy zahrnout interní standard a může být nezbytné provádět korekce na zhášení pomocí přidání interního standardu pro každý jednotlivý vzorek.

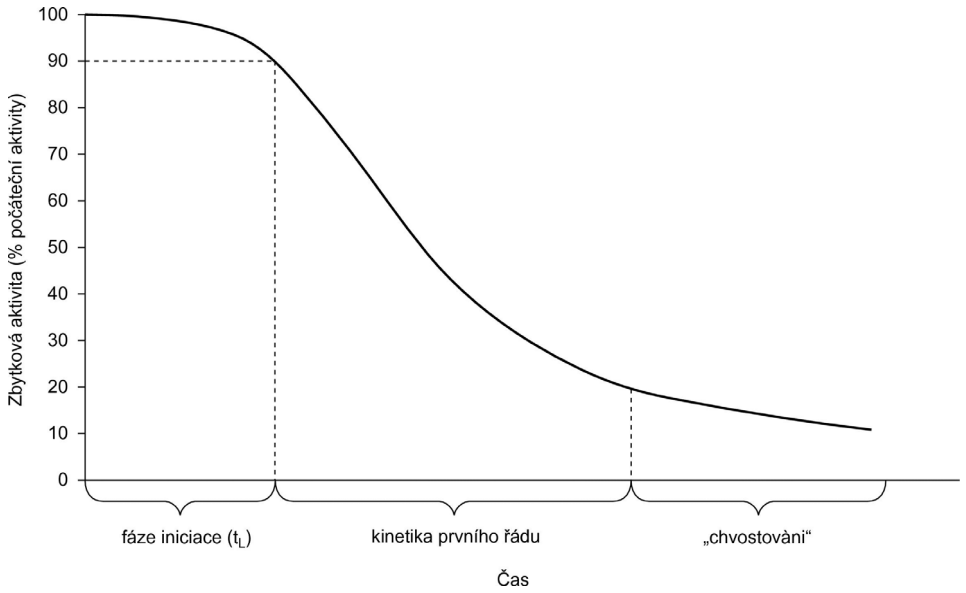
Přímé stanovení $^{14}CO_2$

Měří-li se uvolňovaný $^{14}CO_2$ přímo, je třeba nasadit na počátku zkoušky více baněk, používat jako vzorek vždy celý objem zkušební baňky v každém měřicím bodě, okyselit zkušební baňky na pH 2 až 3 a jímat $^{14}CO_2$ v interním (umístěný v každé zkušební baňce na počátku zkoušky) nebo externím absorbéru. Jako absorpční médium lze používat alkálii (např. 1 N roztok NaOH nebo peleta NaOH), ethanolamin nebo na ethanolaminu založený absorbér a komerčně dostupné absorbéry. Pro přímé měření $^{14}CO_2$ je třeba baňky uzavřít např. septou z butylové pryže.

▼**M1**

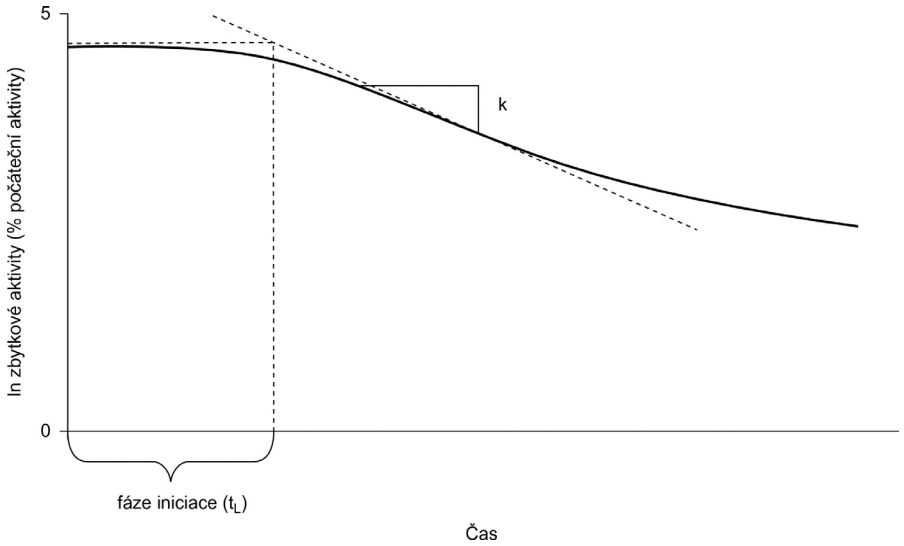
Obrázek 1a

Příklad aritmetického vynášení dat (zbytková aktivita vzhledem k času)



Obrázek 1b

Příklad semilogaritmického vynesení dat (ln zbytkové aktivity vzhledem k času)



▼M1

C.26 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU *LEMNA* SPP.

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 221 (2006) (1). Mezi orgány EU panuje široká shoda v tom, že zkouška na *Lemna* spp. je u intenzivně zbarvených látek vhodnou alternativou ke zkoušce na řasách (2, 3).

1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda je určena k hodnocení toxicity látek pro sladkovodní rostliny rodu *Lemna* (okřehek). Je založena na existujících pokynech (4, 5, 6, 7, 8, 9), ale obsahuje úpravy těchto metod, aby odrážela nejnovější výsledky výzkumu a konzultace v řadě klíčových záležitostí. Navrhovaná metoda byla validována mezinárodní kroužkovou zkouškou (10).

Tato zkušební metoda popisuje zkoušení toxicity pomocí *Lemna gibba* a *Lemna minor*, které byly obě rozsáhle studovány a jsou předmětem shora uvedených norem. Taxonomie *Lemna* spp. je obtížná a je komplikována existencí široké škály fenotypů. Ačkoliv se u *Lemna* může vyskytnout genetická variabilita v odezvě na toxické látky, není v současnosti dostatek údajů o tomto zdroji variability, aby mohl být pro použití v rámci této metody doporučen specifický klon. Je třeba uvést, že zkouška se neprovádí axenicky, ale v jednotlivých stupních během zkušebního procesu se provádí opatření pro udržení kontaminace jinými organismy na minimu.

Podrobně se popisuje zkoušení s obnovením (semistatické a průtokové) a bez obnovení (statické) zkušebního roztoku. V závislosti na cílech zkoušky a právních požadavcích se doporučuje zvážit použití semistatických a průtokových metod, například pro látky, které se z roztoku rychle ztrácí v důsledku odpaření, fotodegradace, srážení nebo biologického rozkladu. Další pokyny jsou uvedeny v (11).

1.2 DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa: je suchá hmotnost živé hmoty přítomné v populaci. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet lístků nebo plocha lístků a používání termínu „biomasa“ rovněž odkazuje na tyto náhradní míry.

Chloróza: je žloutnutí tkáně lístků.

Klon: je organismus nebo buňka vzniklá z jediného jedince asexuální reprodukcí. Jedinci ze stejného klonu jsou proto geneticky identičtí.

Kolonie: znamená soubor mateřských a dceřiných lístků (obvykle 2 až 4) navzájem spolu spojených. Někdy se označuje jako rostlina.

▼M1

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x% (např. 50 %) snížení růstu *Lemna* (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky). Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se pro růstovou rychlost používá symbol „E_rC“ a pro výtěžek „E_yC“ následovaný proměnnou měření, např. E_rC (počet lístků).

Průtoková zkouška: je zkouškou, při níž jsou zkušební roztoky průběžně vyměňovány.

Lístek: je individuální/samostatnou listovitou strukturou rostliny okřehku. Je to nejmenší jednotka, tj. jedinec, schopná reprodukce.

Hrbatost: znamená lístky mající hrbolatý či napuchlý vzhled.

Růst: je zvýšením proměnné měření, např. počtu lístků, suché hmotnosti, hmotnosti za mokra nebo plochy lístků, během doby zkoušky.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost): je logaritmické zvýšení biomasy během období expozice.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): je nejnižší zkušební koncentrací, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Proměnné měření: jsou jakýmkoliv druhem proměnných, které se měří pro vyjádření zkoumaného účinku pomocí jedné či více různých proměnných odezvy. V této metodě jsou proměnnými měření počet lístků, plocha lístků, čerstvá hmotnost a suchá hmotnost.

Monokultura: je kultura s jedním druhem rostliny.

Nekróza: je mrtvá (tj. bílá či vodou nasáklá) tkáň lístku.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (No Observed Effect Concentration, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Fenotyp: je pozorovatelnou charakteristikou organismu určenou interakcí jeho genů s prostředím.

Proměnné odezvy: jsou proměnné pro odhad toxicity odvozené z jakýchkoliv naměřených proměnných, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují z proměnných měření jako např. počtu lístků, plochy lístků, čerstvé hmotnosti nebo suché hmotnosti.

Semistatická (obnovovací) zkouška: je zkouškou, při níž je zkušební roztok během zkoušky ve stanovených intervalech pravidelně nahrazován.

Statická zkouška: je zkušební metoda bez obnovování zkušebního roztoku během zkoušky.

▼M1

Zkoumaný účinek: popisuje obecný faktor, který bude jakožto cíl zkoušky změněn zkoušenou chemickou látkou vzhledem ke kontrole. Při této metodě je zkoumaným účinkem inhibice růstu, kterou lze vyjádřit různými proměnnými odezvy, jež jsou založeny na jedné či více proměnných měření.

Zkušební médium: je úplné syntetické růstové médium, v němž rostou zkušební rostliny při expozici zkoušené látce. Zkoušená látka bude za normálních podmínek ve zkušebním médiu rozpuštěna.

Výtěžek: je hodnota proměnné měření pro vyjádření biomasy na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby.

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Exponenciálně rostoucí kultury rostlin rodu *Lemna* se po dobu sedmi dnů nechají růst jako monokultury v různých koncentracích zkoušené látky. Cílem zkoušky je kvantifikovat účinky související s látkou na vegetativní růst během tohoto období, a to na základě hodnocení zvolených proměnných měření. Primární proměnnou měření je počet lístků. Rovněž se měří nejméně jedna další proměnná měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), protože některé látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pro kvantifikaci účinků souvisejících s látkou se růst ve zkušebních roztocích porovnává s růstem kontrol a stanoví se koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstu (např. 50 %) a vyjádří jako EC_x (např. EC_{50}).

Zkoumaným účinkem je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení proměnné měření (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nutný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako proměnné měření na konci expoziční doby minus proměnné měření na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. E_yC_{50}).

Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.4 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měla by být k dispozici analytická metoda s odpovídající citlivostí pro kvantifikaci látky ve zkušebním médiu.

▼M1

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota, rozpustnost ve vodě, stálost ve vodě na světle, pK_a, $K_{o/v}$, tlak par a biologická rozložitelnost. Pro výpočet Henryho konstanty, která bude ukazovat, zda-li jsou pravděpodobné významné ztráty zkoušené látky během doby zkoušky, lze použít rozpustnost ve vodě a tlak par. To pomáhá zjistit, zda-li by se měly podniknout konkrétní opatření ke kontrole takových ztrát. Jestliže nejsou informace o rozpustnosti a stálosti zkoušené látky jisté, doporučuje se, aby byly hodnoceny za podmínek zkoušky, tj. v růstovém médiu, při teplotě a režimu osvětlení, které mají být při zkoušce použity.

Pokud je zvláště důležitá kontrola pH zkušebního média, např. zkouší-li se kovy nebo látky, které jsou hydrolyticky nestálé, doporučuje se přídavek pufru do růstového média (viz bod 1.7.4 první odstavec). Další pokyny pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které způsobují jejich obtížnou testovatelnost, je uveden v (11).

1.5 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní kruhové zkoušce (10). Doporučuje se zkoušet referenční látku nejméně dvakrát ročně nebo – pokud se zkoušení provádí s menší četností – souběžně se stanovováním toxicity zkoušené látky.

1.6 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být doba do zdvojnásobení počtu lístků v kontrole menší než 2,5 dnů (60 hodin), což odpovídá přibližně sedminásobnému zvýšení za sedm dnů a průměrné specifické růstové rychlosti 0,275 d^{-1}. Při využití médií a zkušebních podmínek popsaných v této zkušební metodě lze tohoto kritéria dosáhnout použitím statické zkoušky (8). Rovněž se předpokládá, že toto kritérium bude splnitelné za podmínek semistatické a průtokové zkoušky. Výpočet doby zdvojnásobení je uveden v bodě 2.1.

1.7 POPIS METODY

1.7.1 **Přístroje a pomůcky**

Veškeré vybavení přicházející od styku se zkušebními médii by mělo být vyrobeno ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu. Skleněné pomůcky použité pro kultivační a zkušební účely je zapotřebí vyčistit od chemických kontaminantů, které by mohly unikat do zkušebního média, a musí být sterilní. Zkušební nádoby by měly být dostatečně široké, aby mohly lístky jednotlivých kolonií v kontrolních nádobách růst, aniž by se na konci zkoušky překrývaly. Není důležité, zda se kořeny dotýkají dna zkušebních nádob, ale doporučuje se, aby v každé zkušební nádobě byla minimální hloubka 20 mm a minimální objem 100 ml. Volba zkušebních nádob není zásadně důležitá, pokud budou splněny tyto požadavky. Jako vhodné se potvrdily skleněné kádinky, krystalizační misky nebo skleněné Petriho misky vhodných rozměrů. Zkušební nádoby musí být zakryty, aby se minimalizovalo odpařování a náhodná kontaminace, přičemž však musí být umožněna nezbytná výměna vzduchu. Vhodné zkušební nádoby a zejména kryty musí zabránit stínění nebo změnám spektrálních charakteristik světla.

▼M1

Kultury a zkušební nádoby by se neměly přechovávat společně. Toho se nejlépe dosáhne pomocí samostatných komor, inkubátorů či místností pro růst za podmínek prostředí. Osvětlení a teplota musí být regulovatelné a musí se udržovat na stálé úrovni (viz bod 1.7.8).

1.7.2 **Testovací organismus**

Organismem použitým pro tuto zkoušku je *Lemna gibba* nebo *Lemna minor*. Krátké popisy druhů okřehků, které byly použity pro zkoušky toxicity, jsou uvedeny v dodatku 1. Rostlinný materiál lze získat ze sbírek kultur, z jiné laboratoře nebo z terénu. Jestliže se sběr provádí z terénu, rostliny by se měly kultivovat ve stejném médiu, jaké se používá ke zkoušení, minimálně po dobu osmi týdnů před použitím. Terénní místa použitá pro sběr výchozích kultur musí být prostá zřejmých zdrojů kontaminace. Pokud se získávají z jiné laboratoře nebo ze sbírek kultur, měly by se podobně uchovávat minimálně po tři týdny. Ve zkušebním protokolu je vždy třeba uvést zdroj rostlinného materiálu a druhů a klonu (je-li znám) použitých ke zkoušení.

Měly by se používat monokultury, které jsou očividně prosté kontaminace jinými organismy, například řasami a prvoky. Zdravé rostliny *L. minor* obsahují kolonie skládající se ze dvou až pěti lístků, zatímco zdravé kolonie *L. gibba* mohou obsahovat až sedm lístků.

Kvalita a jednotnost rostlin použitých pro zkoušku bude mít významný vliv na výsledek zkoušky, a proto by se měla volit s velkou péčí. Měly by se používat mladé, rychle rostoucí rostliny bez viditelných lézí či odbarvení (chlorózy). Kultury dobré kvality se vyznačují vysokým výskytem kolonií obsahujících nejméně dva lístky. Velký počet jednotlivých lístků je ukazatelem environmentálního stresu, např. nedostatku živin, a rostlinný materiál z takovýchto kultur by se ke zkoušení neměl používat.

1.7.3 **Kultivace**

Pro snížení četnosti udržování kultury (např. pokud se na určité období neplánují žádné zkoušky s *Lemna*) lze kultury udržovat za sníženého osvětlení a teploty (4–10 °C). Podrobnosti o kultivaci jsou uvedeny v dodatku 2. Očividné známky kontaminace řasami nebo jinými organismy vyžadují povrchovou sterilizaci dílčího vzorku lístků *Lemna* a následný přenos do čerstvého média (viz dodatek 2). V tomto případě je třeba zbývající kontaminovanou kulturu zlikvidovat.

Nejméně sedm dnů před zkoušením se asepticky převede dostatečný počet kolonií do čerstvého sterilního média a kultivuje se 7 až 10 dnů za podmínek zkoušky.

1.7.4 **Zkušební médium**

Pro *Lemna minor* a *Lemna gibba* se doporučují odlišná média, jak je dále uvedeno. Je třeba pečlivě zvážit zahrnutí pufru pH do zkušebního média (MOPS (3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina, číslo CAS: 1132–61–2; číslo EINECS: 214–478–5) do média pro *L. minor* a $NaHCO_3$ do média pro *L. gibba*), jestliže existuje podezření, že by mohl reagovat se zkoušenou látkou a ovlivňovat expresi její toxicity. Steinbergovo médium (12) je rovněž přijatelné, pokud jsou splněna kritéria validity.

▼M1

Pro kultivaci a zkoušení s *L. minor* se doporučuje úprava švédského standardního (SIS) růstového média pro *Lemna*. Složení tohoto média je uvedeno v dodatku 3.

Ke kultivaci a zkoušení s *L. gibba* se doporučuje růstové médium 20X AAP, popsané v dodatku 3.

Steinbergovo médium, popsané v dodatku 3, je rovněž vhodné pro *L. minor*, ale může se používat i pro *L. gibba*, pokud jsou splněna kritéria validity.

1.7.5 **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky se obvykle připravují ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky zkoušené látky se obyčejně připravují rozpuštěním látky v růstovém médiu.

Nejvyšší zkušební koncentrace zkoušené látky by obvykle neměla překročit rozpustnost látky ve vodě za zkušebních podmínek. Je však třeba poznamenat, že *Lemna* spp. plují na povrchu a mohou být vystaveny působení látek, které se hromadí na rozhraní voda-vzduch (např. látky špatně rozpustné ve vodě nebo hydrofobní či povrchově aktivní látky). Za takových podmínek dochází k expozici jiným látkám, než jaké se nachází v roztoku, a zkušební koncentrace mohou v závislosti na vlastnostech zkoušené látky překračovat rozpustnost ve vodě. Pro zkoušené látky s nízkou rozpustností ve vodě může být nezbytné připravit koncentrovaný zásobní roztok nebo disperzi látky pomocí organického rozpouštědla nebo dispergátoru, aby se usnadnilo přidávání přesných množství zkoušené látky do zkušebního média, a napomohlo se tak její dispergaci a rozpuštění. Měla by být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Používání pomocných rozpouštědel nebo dispergátorů by nemělo způsobovat žádnou fytotoxicitu. Příkladem běžně používaných rozpouštědel, která nezpůsobují fytotoxicitu při koncentracích až do 100 $\mu l \cdot l^{-1}$, jsou aceton a dimethylformamid. Jestliže se použije rozpouštědlo nebo dispergátor, jeho konečná koncentrace by se měla zapsat ve zkušební zprávě a udržovat na minimu ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$) a všechny exponované vzorky a kontroly by měly obsahovat stejnou koncentraci rozpouštědla nebo dispergátoru. Další pokyny k používání dispergátorů jsou uvedeny v (11).

1.7.6 **Zkušební a kontrolní skupiny**

Předběžná znalost toxicity zkoušené látky pro *Lemna*, např. z orientační zkoušky, pomůže při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Při definitivní zkoušce toxicity se zpravidla použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu. Faktor mezi zkušebními koncentracemi by nejlépe neměl překročit 3,2, ale lze použít vyšší hodnotu, jestliže je křivka závislosti koncentrace a odezvy plochá. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. V rámci každé zkušební koncentrace se použijí nejméně tři opakování.

Při volbě rozsahu zkušebních koncentrací (pro orientační a/nebo definitivní zkoušku toxicity) je zapotřebí zvážit následující:

▼M1

— Pro stanovení EC_x by se zkušební koncentrace měly pohybovat pod a nad hodnotu EC_x, aby se zajistila vhodná úroveň spolehlivosti. Například pokud se odhaduje EC_{50}, nejvyšší zkušební koncentrace by měla být vyšší než hodnota EC_{50}. Jestliže hodnota EC_{50} leží mimo rozmezí zkušebních koncentrací, související intervaly spolehlivosti budou velké a správné hodnocení statistické vhodnosti modelu nemusí být možné.

— Jestliže je cílem odhadnout LOEC/NOEC, nejnižší zkušební koncentrace by měla být dostatečně nízká, aby růst nebyl výrazně nižší než růst kontroly. Dále by nejvyšší zkušební koncentrace měla být dostatečně vysoká, aby byl růst výrazně nižší než růst kontroly. Pokud tomu tak není, zkouška se bude muset opakovat v odlišném rozmezí koncentrací (s výjimkou případů, kdy je nejvyšší koncentrace na mezi rozpustnosti nebo je maximální požadovanou limitní koncentrací, např. 100 $mg.l^{-1}$).

Každá zkouška by měla zahrnovat kontroly, pro něž se použije stejné živné médium, stejný počet lístků a kolonií, stejné podmínky okolního prostředí a postupy jako pro zkušební nádoby, avšak neobsahují zkoušenou látku. Jestliže se použije pomocné rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být zahrnuta i další kontrolní expozice s rozpouštědlem/dispergátorem přítomným ve stejné koncentraci jako v nádobách se zkoušenou látkou. Počet kontrolních nádob použitých k opakování (a případných nádob s rozpouštědly) by měl být nejméně roven počtu nádob použitých pro každou zkušební koncentraci; v ideálním případě by měl být dvojnásobný.

Jestliže se stanovení NOEC nepožaduje, plán zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet opakování na příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování však musí být nejméně tři.

1.7.7 **Expozice**

Kolonie tvořené 2 až 4 viditelnými lístky se převedou z očkovací kultury a za aseptických podmínek se náhodně přiřadí do zkušebních nádob. Každá nádoba by měla celkem obsahovat 9 až 12 lístků. Počet lístků a kolonií by měl být v každé zkušební nádobě stejný. Zkušenosti získané s touto metodou a údaje z kruhové zkoušky ukazují, že použití tří opakování na expozici, přičemž pro každé opakování se zpočátku použije od 9 do 12 lístků, dostačuje ke zjištění rozdílů v inhibici růstu přibližně o 4 až 7 % vypočítané pomocí růstové rychlosti (10 až 15 % počítáno pomocí výtěžku) mezi jednotlivými expozicemi (10).

K minimalizaci vlivu prostorových rozdílů v intenzitě světla nebo v teplotě je potřebné náhodné uspořádání zkušebních nádob v inkubátoru. Při provádění pozorování se rovněž vyžaduje uspořádání do bloků nebo náhodné přemísťování nádob (nebo častější přemísťování).

▼M1

Jestliže předběžná zkouška stálosti ukazuje, že během doby trvání zkoušky (7 dnů) nelze udržet koncentraci zkoušené látky (tj. měřená koncentrace poklesne pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), doporučuje se semistatická zkouška. V tomto případě by měly být kolonie nejméně dvakrát během zkoušky (např. v den 3 a 5) vystaveny čerstvě připraveným zkušebním a kontrolním roztokům. Četnost expozice čerstvému médiu závisí na stálosti zkoušené látky; pro udržení téměř konstantních koncentrací vysoce nestálých či těkavých látek může být zapotřebí vyšší četnost. Za určitých okolností může být nutný průtokový postup (11, 13).

Scénář expozice prostřednictvím aplikace na lístek (rozprašování) není do této zkušební metody zahrnut, avšak tomuto tématu se věnuje literatura (14).

1.7.8 **Inkubační podmínky**

Pomocí kontinuálního teplého nebo chladného bílého fluorescenčního osvětlení je třeba zajistit světelnou intenzitu zvolenou z rozmezí 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, přičemž se tato intenzita měří při fotosynteticky aktivním záření (400 až 700 nm) v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako lístky *Lemna* (ekvivalent 6 500 až 10 000 luxů). Jakékoliv odchylky od zvolené světelné intenzity nad zkušební plochou by neměly překročit ±15 %. Naměřenou hodnotu bude ovlivňovat metoda detekce světla a měření, zejména typ čidla. Kulová čidla (která reagují na světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření) a „kosinová“ čidla (která reagují na světlo ze všech úhlů nad rovnou měření) jsou vhodnější než jednosměrná čidla, neboť poskytují vyšší naměřené hodnoty pro vícebodový světelný zdroj zde popsaného typu.

Teplota ve zkušebních nádobách by měla být (24 ± 2) °C. Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. Ovšem odchylka o více než 1,5 nebude znamenat neplatnost zkoušky, pokud je možné prokázat, že byla splněna kritéria validity. Zvláštní pozornost je zapotřebí věnovat posunu pH ve zvláštních případech, jako jsou zkoušky nestálých látek nebo kovů. Další pokyny naleznete v (11).

1.7.9 **Doba trvání**

Zkouška je ukončena za 7 dnů poté, co byly rostliny převedeny do zkušebních nádob.

1.7.10 **Měření a analytická stanovení**

Na počátku zkoušky se určí a zaznamená počet lístků ve zkušebních nádobách, přičemž se pečlivě dbá na to, aby byly započítány vystupující, jasně viditelné lístky. Na počátku zkoušky, dále nejméně jednou během každých 3 dnů během expoziční doby (tj. nejméně dvakrát během celkové doby 7 dnů) a při ukončení zkoušky se musí určit počty lístků, které mají normální či abnormální vzhled. Je zapotřebí zaznamenat ve zkušební zprávě změny ve vývoji rostlin, např. velikost lístku, vzhled, známky nekrózy, chlorózy nebo hrbatosti, rozpadávání kolonií nebo ztráta vzplývavosti a v délce a vzhledu kořenu. Je rovněž nutné zaznamenat významné vlastnosti zkušebního média (např. přítomnost nerozpuštěného materiálu, růst řas ve zkušební nádobě).

▼M1

Kromě určení počtu lístků během zkoušky se také hodnotí účinky zkoušené látky na jednu (nebo více) následujících proměnných měření:

i) celková plocha lístků,

ii) suchá hmotnost,

iii) čerstvá hmotnost.

Celková plocha lístků má tu výhodu, že ji lze u každé zkušební a kontrolní nádoby určit na počátku zkoušky, v jejím průběhu i na jejím konci. Suchá nebo čerstvá hmotnost by se měla určit na počátku zkoušky ze vzorku očkovací kultury, jaké se obvykle používá k zahájení zkoušky, a na konci zkoušky pak na základě rostlinného materiálu z každé zkušební a kontrolní nádoby. Jestliže se plocha lístků neměří, dává se přednost suché hmotnosti před čerstvou hmotností.

Celková plocha lístků, suchá hmotnost a čerstvá hmotnost se mohou určit následovně:

i) Celková plocha lístků: Celková plocha lístků všech kolonií může být stanovena analýzou obrazu. Pomocí videokamery lze zachytit siluetu zkušební nádoby a rostlin (tj. umístíte nádobu na svítící skříň) a výsledný obraz se digitalizuje. Plochu lístků ve zkušební nádobě lze poté stanovit kalibrací pomocí plochých tvarů o známé ploše. Je třeba dbát na vyloučení rušení způsobeného hranou zkušební nádoby. Alternativní, ale pracnější způsob spočívá v pořízení fotografie zkušebních nádob a rostlin, vyříznutí výsledné siluety kolonií a určení jejich plochy pomocí analyzátoru lístkové plochy nebo milimetrového papíru. Mohou být vhodné i další postupy (například poměr hmotnosti papíru mezi plochou siluety kolonií a jednotkovou plochou).

ii) Suchá hmotnost: Z každé ze zkušebních nádob se shromáždí všechny kolonie a propláchnou se destilovanou nebo deionizovanou vodou. Nadbytečná voda se odstraní savým papírem a pak se vzorky suší při 60 °C do konstantní hmotnosti. Měly by být zahrnuty jakékoliv úlomky kořenů. Suchá hmotnost by se měla vyjádřit s přesností na nejméně 0,1 mg.

iii) Čerstvá hmotnost: Všechny kolonie se převedou do předem zvážených polystyrenových zkumavek (nebo vyrobených z jiného interního materiálu) s malými (1 mm) otvory v zakulacených dnech. Zkumavky se poté odstřeďují při 3 000 ot/min po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky obsahující nyní osušené kolonie se opětovně zváží a čerstvá hmotnost se vypočítá odečtením hmotnosti prázdné zkumavky.

1.7.10.1 *Četnost měření a analytická stanovení*

Jestliže se používá plán statické zkoušky, pH každé expozice by se mělo změřit na počátku a na konci zkoušky. Jestliže se používá plán semistatické zkoušky, pH by se mělo měřit v každé vsázce „čerstvého“ zkušebního roztoku před každým obnovením a rovněž i v odpovídajících „spotřebovaných“ roztocích.

▼M1

Intenzita osvětlení by se měla měřit v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako lístky *Lemna*. Měření je třeba provádět nejméně jednou během zkoušky. Teplota média v náhradní nádobě držené za stejných podmínek v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti by se měla zaznamenávat nejméně jednou denně.

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech. Ve statických zkouškách je minimálním požadavkem určení koncentrací na počátku a na konci zkoušky.

U semistatických zkoušek, u nichž se neočekává, že koncentrace zkoušené látky zůstane v rozmezí ±20 % nominální koncentrace, je nezbytné analyzovat všechny čerstvě připravené zkušební roztoky a tytéž roztoky při každém obnovení (viz bod 1.7.7 třetí odstavec). Ovšem u těch zkoušek, u nichž nejsou naměřené počáteční koncentrace zkoušené látky v rozmezí ±20 % nominální hodnoty, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), mohou být chemická stanovení provedena pouze na nejvyšších a nejnižších zkušebních koncentracích. Ve všech případech je třeba provést určení koncentrací zkoušené látky před obnovením při každé zkušební koncentraci vždy pouze u jedné nádoby k opakování (nebo u sdruženého obsahu nádob jednoho opakování).

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek včetně analýzy na počátku, uprostřed a na konci zkoušky, ale měření „spotřebovaného“ roztoku není v tomto případě vhodné. U tohoto typu zkoušky je zapotřebí kontrolovat denně průtok ředicí vody a zkoušené látky nebo zásobního roztoku zkoušené látky.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ±20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ±20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené látky (11).

1.7.11 **Limitní zkouška**

Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg l^{-1} nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může být provedena limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg l^{-1} nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria validity se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že počet opakování s exponovanými vzorky by se měl zdvojnásobit. Růst v kontrolní a exponované skupině může být analyzován pomocí statistického testu pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu.

▼M1

2. **DATA A ZPRÁVY**

2.1 DOBA ZDVOJNÁSOBENÍ

Pro stanovení doby zdvojnásobení (T_d) počtu lístků a dodržování tohoto kritéria validity ve studii (bod 1.6) se používá následující vzorec s údaji získanými z kontrolních nádob:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kde μ je průměrná specifická růstová rychlost určená podle bodu 2.2.1 prvního a druhého odstavce.

2.2 PROMĚNNÉ ODEZVY

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené látky na vegetativní růst *Lemna*. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

a) Průměrná specifická růstová rychlost: tato proměnná odezvy se počítá na základě změn logaritmů počtů lístků a dále na základě změn logaritmů jiného parametru měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) v čase (vyjádřeno na den) v kontrolách a každé exponované skupině. Někdy se označuje jako relativní růstová rychlost (15).

b) Výtěžek: tato proměnná odezvy se počítá na základě změn počtu lístků a dále na základě změn jiného parametru měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) v kontrolách a každé exponované skupině až do konce zkoušky.

Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou všeobecně vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to díky matematické základně příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu okřehku v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontroly, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy „výtěžek“ jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. E_yC_x závisí na specifické růstové rychlosti druhů okřehku použitých v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých klonů lišit. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy okřehku nebo dokonce různými klony. Přestože se z vědeckého hlediska dává přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti pro odhad toxicity, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současné právní požadavky v některých zemích.

▼M1

Odhady toxicity by měly být založeny na počtu lístků a na jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), protože některé látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pouhým určováním počtu lístků by se tento účinek nezjistil.

Počet lístků a jakákoliv další zaznamenaná proměnná měření, tj. celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost, se pro každé měření uvedou v tabulce společně s koncentracemi zkoušené látky. Následná analýza dat, např. odhad LOEC, NOEC nebo EC_x, by měla být založena na hodnotách pro jednotlivá opakování, a nikoliv na vypočítaných středních hodnotách pro každou exponovanou skupinu.

2.2.1 **Průměrná specifická růstová rychlost**

Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení proměnných růstu – počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) – pomocí následujícího vzorce pro každé opakování kontrolních roztoků a exponovaných roztoků:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

— μ_i–j: průměrná specifická růstová rychlost od doby *i* do doby *j*,

— N_i: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době *i*,

— N_j: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době *j*,

— t: čas od *i* do *j*.

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu vypočítejte střední hodnotu růstové rychlosti a odhady rozptylu.

Průměrná specifická růstová rychlost by se měla vypočítat pro celou dobu trvání zkoušky (doba „*i*“ ve shora uvedeném vzorci je počátkem zkoušky a doba „*j*“ je ukončením zkoušky). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu průměrné specifické růstové rychlosti a odhady rozptylu. Dále je zapotřebí vyhodnocovat růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené látky, které se vyskytly během expoziční doby (např. kontrolou logaritmicky transformovaných růstových křivek). Významné rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek. V tomto případě by konzervativní přístup spočíval v porovnání specifických růstových rychlostí exponovaných kultur během doby maximální inhibice se specifickými růstovými rychlostmi kontrol pro totéž období.

▼M1

Procentuální inhibici růstové rychlosti (I_r) lze potom vypočítat pro každou zkušební koncentraci (exponovaná skupina) podle následujícího vzorce:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

— $\% I_r$: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

— μ_C: střední hodnota μ v kontrolní skupině,

— μ_T: střední hodnota μ v exponované skupině.

2.2.2 **Výtěžek**

Účinky na výtěžek se určují na základě dvou proměnných měření, tj. počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), přítomných v každé zkušební nádobě na počátku a konci zkoušky. Pro suchou hmotnost nebo čerstvou hmotnost se počáteční biomasa určuje na základě vzorku lístků odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob (viz bod 1.7.3 druhý odstavec). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu výtěžku a odhady rozptylu. Střední procentuální inhibici výtěžku ($\%I_y$) lze vypočítat pro každou exponovanou skupinu následovně:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

kde:

— $\% I_y$: procentuální snížení výtěžku,

— b_C: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro kontrolní skupinu,

— b_T: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro exponovanou skupinu.

2.2.3 **Vynášení křivek závislosti koncentrace-odezva**

Je zapotřebí vynést křivky závislosti koncentrace na odezvě vyjadřující vztah střední procentuální inhibice proměnné odezvy (I_r nebo I_y vypočítané podle pokynů v bodě 2.2.1 posledním odstavci nebo v bodě 2.2.2) a logaritmu koncentrace zkoušené látky.

2.2.4 **Odhad EC_x**

Odhady EC_x (např. EC_{50}) by měly být založeny jak na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x), tak na výtěžku (E_yC_x) a obě tyto hodnoty by zase měly vycházet z počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost). Důvodem je skutečnost, že existují zkoušené látky, které mají odlišný dopad na počet lístků a na další proměnné měření. Požadovanými parametry toxicity jsou proto čtyři hodnoty EC_x pro každou vypočítanou hodnotu inhibice x: E_rC_x (počet lístků), E_rC_x (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), E_yC_x (počet lístků) a E_yC_x (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost),

▼M1

2.3 STATISTICKÉ POSTUPY

Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy, například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (16), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (16). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s kvantálními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby mohly být použity s daty růstové rychlosti či výtěžku. Speciální postupy pro stanovení hodnot EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (17, 18 a 19).

Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, použijte vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Jakost shodnosti dat odezvy s regresním modelem je zapotřebí vyhodnotit buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin.

Odhady EC_{50} a intervaly spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (20), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (21, 22, 23, 24). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (25). Mezi vhodné testy patří Levenův a Bartlettův test. Nesplnění předpokladu o homogenitě rozptylů lze někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako jsou testy sestupného trendu Jonckheere. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (19).

Vědecký vývoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regrese. Vhodná hodnota pro x nebyla pro tuto zkoušku s *Lemna* stanovena. Nicméně se zdá, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly uvádět jak EC_{10}, tak EC_{20}.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti včetně meze rozpustnosti ve vodě,

▼M1

— údaje o chemické identifikaci (např. číslo CAS) včetně čistoty.

Testovací druhy:

— vědecký název, klon (je-li znám) a zdroj.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (statický, semistatický nebo průtokový),

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— zkušební médium,

— popis experimentálního provedení: zkušební nádoby a kryty, objemy roztoků, počty kolonií a lístků na zkušební nádobu na počátku zkoušky,

— zkušební koncentrace (nominální, popř. naměřené) a počet opakování na každou koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků včetně použití jakýchkoliv rozpouštědel nebo dispergátorů,

— teplota během zkoušky,

— zdroj světla, intenzita světla a homogenita,

— hodnoty pH zkušebních a kontrolních médií,

— koncentrace zkoušené látky a metoda analýzy s příslušnými údaji pro hodnocení jakosti (validační studie, směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti analýz),

— metody pro určení počtu lístků a dalších proměnných měření, např. suchá hmotnost, čerstvá hmotnost nebo plocha lístků,

— všechny odchylky od této zkušební metody.

Výsledky:

— hrubá data: počet lístků a dalších proměnných měření v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování a každé analýze,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou proměnnou měření,

— růstové křivky pro každou koncentraci (doporučuje se s logaritmicky transformovanou proměnnou měření, viz bod 2.2.1 druhý odstavec),

— doba zdvojnásobení/růstová rychlost v kontrole na základě počtu lístků,

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačním koeficientem pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a účinku,

— odhady toxických účinků pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a/nebo NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

▼M1

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,

— jakékoliv vizuální známky fytotoxicity, jakož i pozorování zkušebních roztoků,

— diskuse výsledků včetně jakéhokoliv vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

4. **LITERATURA**

(1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

(2) O použití studií na *Lemna* spp. u zbarvených látek pojednává oddíl 13.5.3 publikace EU *Manual of Decisions* z července 2006, která je dostupná na internetových stránkách http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals.

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment – kapitola R.7b: Endpoint specific guidance; tabulka 7.8.3: Summary of difficult substance testing issues, dostupné na internetových stránkách

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). s. 733–742. *In*: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96–156. 8 stran.

(6) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 stran.

(7) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 stran (švédsky).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37, 120 stran.

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3–77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353–359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713–718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157–167.

(18) Bruce R.D., Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485–1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(25) Brain P., Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93–96.

▼M1

Dodatek 1

Popis *Lemna* spp.

Vodní rostlina označovaná jako okřehek, *Lemna* spp., patří do čeledi *Lemnaceae*, která zahrnuje celosvětově rozšířené druhy ve čtyřech rodech. Jejich vzhled a taxonomie byly popsány vyčerpávajícím způsobem (1, 2). *Lemna gibba* a *L. minor* jsou představitelé druhů mírných oblastí a běžně se používají pro zkoušky toxicity. Oba druhy mají plovoucí nebo ponořenou lodyžku diskového tvaru (lístek) a ze středu spodní části každého lístku vychází velmi tenký kořínek. *Lemna* spp. zřídkakdy kvetou a rostliny se množí vegetativně vytvářením nových lístků (3). Při srovnání se staršími rostlinami jsou mladší rostliny světlejší, mají kratší kořínky a skládají se ze dvou až tří lístků různých velikostí. Díky své malé velikosti, jednoduché struktuře, asexuálnímu rozmnožování a krátké generační době jsou rostliny rodu *Lemna* velmi vhodné pro laboratorní zkoušení (4, 5).

Z důvodu pravděpodobných mezidruhových rozdílů v citlivosti jsou platná pouze srovnání citlivosti v rámci druhu.

Příklady druhů *Lemna*, které byly použity ke zkoušení: odkazy na druhy

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. *J. Phys. Chem*., 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96–156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Švédský normalizační institut (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 stran (švédsky).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). s. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96–156. 8 stran.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). *Ecotoxicol. Environ. Saf*., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. and Chem*., 12:481–483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. *Verh.-Int. Ver. Limnol*., 19:2102–2111.

Zdroje druhů Lemna

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
Tel.: +1–416–978–3641
Fax:+1–416–978–5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
USA
Tel.: 001 (919) 515–7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institutionen före tillämpad miljövetenskap (ITM) Stockholms universitet
SE-106 91 Stockholm
ŠVÉDSKO
Tel.: +46 86747240
Fax: +46 86747636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Německo
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Literatura

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27:221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82–991150–0–0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution*, Ser B, 11:1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52:7–22.

▼M1

Dodatek 2

Uchovávání zásobní kultury

Zásobní kultury lze uchovávat za nízkých teplot (4–10 °C) po delší dobu, aniž by bylo zapotřebí je znovu zakládat. Růstové médium pro *Lemna* může být stejné jako médium používané ke zkoušení, ale pro zásobní kultury lze použít jiná média bohatá na živiny.

Pravidelně se odebere několik mladých, světlezelených rostlin a aseptickým postupem se umístí do nových kultivačních nádob obsahujících čerstvé médium. Za chladnějších podmínek, které se zde navrhují, lze provádět tvorbu dílčích kultur v intervalech až do tří měsíců.

Je třeba používat chemicky čisté (kyselinou promyté) a sterilní skleněné kultivační nádoby a pracovat aseptickými manipulačními postupy. V případě kontaminace zásobní kultury např. řasami či kvasinkami, je nezbytné přijmout opatření na odstranění kontaminujících organismů. V případě řas a většiny dalších kontaminujících organismů toho lze dosáhnout povrchovou sterilizací. Odebere se vzorek kontaminovaného rostlinného materiálu a odříznou se kořeny. Materiál se poté intenzivně protřepává v čisté vodě, poté následuje ponoření do 0,5 % (obj.) roztoku chlornanu sodného po dobu 30 sekund až 5 minut. Rostlinný materiál se dále opláchne sterilní vodou a převede se jako řada vsázek do kultivačních nádob obsahujících čerstvé růstové médium. Mnoho lístků v důsledku tohoto ošetření odumře, zejména použijí-li se delší expoziční doby, ale některé z přeživších rostlin budou obvykle zbaveny kontaminace. Ty lze poté použít pro přeočkování nových kultur.

▼M1

Dodatek 3

Média

Pro *L. minor* a *L. gibba* se doporučují různá růstová média. Pro *L. minor* se doporučuje upravené švédské standardní (SIS) médium, zatímco pro *L. gibba* se doporučuje médium 20X AAP. Složení obou médií je uvedeno níže. Při přípravě těchto médií je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

Švédské standardní (SIS) růstové médium pro *Lemna*

— Zásobní roztoky I–V se sterilizují v autoklávu (120 °C, 15 minut) nebo membránovou filtrací (přibližná velikost pórů 0,2 μm).

— Zásobní roztok VI (a případně VII) se sterilizují pouze membránovou filtrací, neautoklávují se.

— Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Zásobní roztoky I až V je třeba zlikvidovat po šesti měsících, zatímco zásobní roztoky VI (a případně VII) mají životnost jeden měsíc.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku ($g.l^{-1}$)	Koncentrace v připraveném médiu ($mg.l^{-1}$)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (pufr)	490	490	—	—

— Pro přípravu jednoho litru média SIS se do 900 ml deionizované vody přidá:

— 10 ml zásobního roztoku I,

— 5 ml zásobního roztoku II,

— 5 ml zásobního roztoku III,

— 5 ml zásobního roztoku IV,

▼M1

— 1 ml zásobního roztoku V,

— 5 ml zásobního roztoku VI,

— 1 ml zásobního roztoku VII (volitelné).

Poznámka: Pro některé zkoušené látky možná bude zapotřebí další zásobní roztok VII (pufr MOPS) (viz bod 1.4 poslední odstavec).

— pH se upraví na 6,5 ± 0,2 přidáním 0,1M nebo 1M-HCl nebo NaOH a objem se doplní deionizovanou vodou do jednoho litru.

Růstové médium 20X AAP

Zásobní roztoky se připravují ve sterilní destilované nebo deionizované vodě.

Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Za těchto podmínek budou mít zásobní roztoky životnost nejméně 6 až 8 týdnů.

Pro médium 20X AAP se připraví pět zásobních roztoků živin (A1, A2, A3, B a C), přičemž se použijí chemické látky na úrovni činidel. Růstové médium se vytvoří přidáním 20 ml každého zásobního roztoku živin do přibližně 850 ml deionizované vody. pH se upraví na 7,5 ± 0,1 přidáním 0,1M nebo 1M-HCl nebo NaOH a objem se doplní do jednoho litru deionizovanou vodou. Médium se poté filtruje přes (přibližně) 0,2μm membránový filtr do sterilního zásobníku.

Růstové médium určené ke zkoušení by se mělo připravovat 1 až 2 dny před použitím, aby se mohlo stabilizovat pH. pH růstového média by se před použitím mělo zkontrolovat a znovu upravit, bude-li to nezbytné, přídavkem 0,1M nebo 1M-NaOH či HCl, jak je popsáno výše.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku ($g.l^{-1}$) (*)	Koncentrace v připraveném médiu ($mg.l^{-1}$) (*)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Pokud není uvedeno jinak.

▼M1

Poznámka pod čarou: Teoreticky správná konečná koncentrace hydrogenuhličitanu (při níž není nutná výrazná úprava pH) je 15 mg/l, nikoliv 300 mg/l. Ovšem historické používání média 20X AAP včetně kruhové zkoušky pro tuto metodu je založeno na 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency).

STEINBERGOVO médium (podle ISO 20079)

Koncentrace a zásobní roztoky

— Upravené Steinbergovo médium se v normě ISO 20079 používá pouze pro *Lemna minor* (protože uvedená norma povoluje pouze *Lemna minor*), ale zkoušky ukázaly, že by se mohlo dosáhnout dobrých výsledků i s *Lemna gibba*.

— Při přípravě média je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

— Připravte živné médium ze zásobních roztoků nebo desetinásobně koncentrovaného média, které umožňuje maximální koncentraci média bez srážení.

Tabulka 1

STEINBERGOVO médium se stabilizovaným pH (upraveno podle Altenburgera)

Látka		Živné médium	
Makroprvky	molekulová hmotnost	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroprvky	molekulová hmotnost	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
dinatrium-EDTA dihydrát	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

Tabulka 2

Zásobní roztoky (makroprvky)

1. **Makroprvky (50 násobně koncentrované)**	g/l
Zásobní roztok 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Zásobní roztok 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Zásobní roztok 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabulka 3

Zásobní roztoky (mikroprvky)

2. **Mikroprvky (1 000 násobně koncentrované)**	mg/l
Zásobní roztok 4:	
H_3BO_3	120,0
Zásobní roztok 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Zásobní roztok 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Zásobní roztok 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Zásobní roztok 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Ethylendiamintetraoctan dvojsodný-dihydrát	1 500,00

— Zásobní roztoky 2 a 3 a odděleně 4 až 7 lze sdružovat (při zohlednění požadovaných koncentrací).

— K dosažení delší životnosti autoklávujte zásobní roztoky při teplotě 121 °C po dobu 20 minut nebo alternativně proveďte sterilní filtraci (0,2 μm). U zásobního roztoku 8 se důrazně doporučuje sterilní filtrace (0,2 μm).

Příprava konečné koncentrace STEINBERGOVA média (upraveného)

— Přidejte 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz tabulka 2) do přibližně 900 ml deionizované vody, aby se zabránilo srážení.

— Přidejte 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz tabulka 3).

— pH by mělo být 5,5 ± 0,2 (upravte přidáním minimálního objemu roztoku NaOH nebo HCl).

▼M1

— Doplňte vodou do 1 000 ml.

— Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije-li se vhodná voda, žádná další sterilizace není zapotřebí. Pokud se sterilizuje konečné médium, zásobní roztok 8 se přidá po autoklávování (při teplotě 121 °C po dobu 20 min).

Příprava 10násobně koncentrovaného STEINBERGOVA média (upraveného) pro přechodné uložení

— Přidejte 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz tabulka 2) do přibližně 30 ml vody, aby se zabránilo srážení.

— Přidejte 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz tabulka 3). Doplňte vodou do 100 ml.

— Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije-li se vhodná voda, žádná další sterilizace není zapotřebí. Pokud se sterilizuje konečné médium, zásobní roztok 8 se přidá po autoklávování (při teplotě 121 °C po dobu 20 minut).

— pH média (konečná koncentrace) by mělo být 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 218 (2004). Tato zkušební metoda je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice larev sladkovodních pakomárů *Chironomus* sp. žijících v sedimentu chemickým látkám. Je založena na stávajících protokolech o zkoušce toxicity p*ro Chironomus riparius* a *Chironomus tentans,* která byla vyvinuta v Evropě (1, 2, 3) a v Severní Americe (4, 5, 6, 7, 8) a ověřována v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (1, 6, 9). Lze užít rovněž další dobře zdokumentované druhy pakomárů, jako například *Chironomus yoshimatsui* (10, 11).

2. Scénář expozice užitý při této zkušební metodě je vmíchání zkoušené látky do sedimentu. Výběr vhodného scénáře expozice závisí na zamýšleném použití testu. Účelem scénáře vmíchání látky do sedimentu je simulovat nahromaděné množství chemických látek přetrvávajících v sedimentu. Tento systém expozice zahrnuje vmíchání látky do sedimentu ve zkušebním systému sediment–voda.

3. Látky, které je třeba testovat z hlediska organismů žijících v sedimentu, v této složce obvykle přetrvávají po dlouhá časová období. Expozici organismů žijících v sedimentu lze zajistit celou řadou možných cest. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovým toxickým účinkům, jsou závislé na fyzikálně chemických vlastnostech dotčené chemické látky. V případě silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo pro chemické látky s kovalentní vazbou na sediment může být významnou expoziční cestou požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity vysoce lipofilních látek, lze zvážit užití potravy přidané do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky. Aby bylo možné zohlednit všechny potenciální způsoby expozice, zaměřuje se tato zkušební metoda na dlouhodobou expozici. Délka trvání zkoušky se pohybuje v rozmezí 20–28 dní pro *C. riparius* and *C. yoshimatsui* a 28–65 dní pro *C. tentans*. Pokud jsou pro konkrétní účel, například pro studium účinků nestabilní chemické látky, potřebné krátkodobé údaje, mohou být další duplikátní vzorky po deseti dnech odstraněny.

4. Měřené výsledné účinky se rovnají celkovému počtu vylíhlých dospělců a času do vylíhnutí. Pokud jsou nezbytné další krátkodobé údaje, doporučuje se provádět měření přežití a růstu larev až po uplynutí desetidenního období, podle potřeby s využitím dalších duplikátních vzorků.

5. Doporučuje se použití sedimentu doplněného přísadami. Přísadami doplněný sediment má několik výhod oproti přírodním sedimentům:

   — jeho experimentální variabilita je snížena, protože tvoří reprodukovatelnou „standardizovanou matrici“ a je eliminována potřeba hledat zdroje nekontaminovaného čistého sedimentu,

   — zkoušky lze zahájit kdykoliv, aniž by bylo nutno čelit sezonním výkyvům zkušebního sedimentu, a sediment není třeba předem upravit, aby se z něj odstranili původní živočichové; užití přísadami doplněného sedimentu také snižuje náklady spojené s terénním shromažďováním dostatečného množství sedimentu pro rutinní testování,

   — užití přísadami doplněného sedimentu umožňuje porovnání toxicity a odpovídající řazení látek.

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M4

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Larvy pakomárů v prvním instaru jsou vystaveny koncentračnímu rozmezí zkoušené chemické látky v systému sediment–voda. Zkoušená látka se vmíchá do sedimentu a následně jsou do zkušebních kádinek se stabilizovanou koncentrací sedimentu a vody nasazeny larvy prvního instaru. Na konci zkoušky se měří rychlost líhnutí a vývoje pakomárů. V případě potřeby lze po 10 dnech měřit rovněž přežití larev a jejich hmotnost (v případě potřeby lze použít další duplikátní vzorky). Tyto údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila x% snížení líhnutí nebo přežití či růstu larev (např. EC_{15}, EC_{50}, atd.), nebo s využitím testování statistických hypotéz pro stanovení NOEC/LOEC. Posledně uvedená metoda vyžaduje srovnání hodnoty účinku s kontrolními hodnotami pomocí statistických testů.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

8. Měla by být známa rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její tlak par, naměřená nebo vypočtená distribuce v sedimentu a stabilita ve vodě a sedimentu. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro kvantitativní stanovení zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, kapilární vodě a v sedimentu, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Užitečné informace zahrnují strukturní vzorec a čistotu zkoušené chemické látky. Užitečnou informací je rovněž chemický osud zkoušené chemické látky (např. zánik, abiotický a biotický rozklad atd.). Další návod pro zkoušení látek s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v položce seznamu literatury (12).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Referenční chemické látky mohou být pravidelně kontrolovány pro ověření, že zkušební podmínky a protokol o zkoušce jsou spolehlivé. Příkladem referenčních toxických látek úspěšně použitých v mezilaboratorních zkouškách a validačních studiích jsou lindan, trifluralin, pentachlorfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1, 2, 5, 6, 13).

PLATNOST ZKOUŠKY

10. Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

— vylíhnutí v kontrolních nádobách musí být na konci zkoušky nejméně 70 % (1, 6),

— k líhnutí dospělců *C. riparius* a *C. yoshimatsui* v kontrolních nádobách by mělo dojít mezi 12. a 23. dnem po jejich zavedení do nádob; pro *C. tentans* je nutná doba 20–65 dnů,

— na konci zkoušky se v každé nádobě změří pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace kyslíku by měla činit alespoň 60 procent hodnoty nasycení vzduchem (ASV) při použité teplotě a pH vody nad sedimentem by se mělo ve všech zkušebních nádobách pohybovat v rozmezí pH 6–9,

— teplota vody by se neměla lišit o více než ± 1,0 °C. Teplota vody může být řízena v izotermální místnosti a v tomto případě by měla být teplota v místnosti ve vhodném časovém intervalu potvrzována.

▼M4

POPIS METODY

Zkušební nádoby

11. Studie se provádí ve skleněných 600ml kádinkách o průměru 8 cm. Vhodné jsou i jiné nádoby, ale měly by zaručit odpovídající hloubku vody nad sedimentem a sedimentu. Plocha sedimentu by měla být dostatečná, aby poskytovala 2 až 3 cm^2 na larvu. Poměr hloubky sedimentu k hloubce vody nad sedimentem by měl být 1:4. Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkušebním systémem, by měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu (např. z teflonu).

Výběr druhů

12. Při zkoušce má být přednostně užito druhu *Chironomus riparius*. Vhodný je i druh *Chironomus tentans*, avšak hůře se s ním manipuluje a vyžaduje i delší trvání zkoušky. Lze užít rovněž druh *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o kultivačních metodách pro druh *Chironomus riparius* jsou uvedeny v dodatku 2. Informace o kultivačních podmínkách jsou k dispozici také pro jiné druhy, tj. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikace druhu musí být potvrzena před zkouškou, ale není vyžadována před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z domácí kultury.

Sediment

13. Při zkoušce se doporučuje přednostně užívat přísadami doplněný sediment (nazývaný rovněž rekonstituovaný, artificiální nebo syntetický sediment). Pokud se však použije přírodní sediment, je potřeba ho charakterizovat (alespoň pH, obsah organického uhlíku a doporučuje se i stanovení dalších parametrů, jako je poměr C/N a zrnitost), a měl by být prost veškerého znečištění a dalších organismů, které by mohly pakomárům konkurovat nebo je konzumovat. Doporučuje se také přírodní sediment před použitím při zkoušce toxicity pro pakomáry kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následující zkoušce. Pro použití v této zkoušce se doporučuje následující přísadami doplněný sediment založený na umělé půdě užité při zkušební metodě C.8 (14) (1, 15, 16):

a) 4–5 % (sušiny) rašeliny s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; je důležité, aby byla ve formě prášku, jemně namletá (velikost částic $\leq$ 1 mm) a sušená výhradně na vzduchu;

b) 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d) přidá se deionizovaná voda s cílem dosáhnout 30–50 % vlhkosti v konečné směsi;

e) přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5. Obsah organického uhlíku v konečné směsi by měl být 2 % (± 0,5 %) a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c).

14. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jednotlivé složky sedimentu by měly být kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické sloučeniny, organofosforové sloučeniny atd.). Příklad přípravy přísadami doplněného sedimentu je popsán v dodatku 3. Přijatelné je i míchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. plovoucí částice rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány.

▼M4

Voda

15. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přípustné ředicí vody uvedeným v dodatcích 2 a 4. Jakákoli vhodná voda, přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda (viz příloha 2) nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako kultivační a zkušební voda, pokud v ní pakomáři přežijí po dobu kultivace a zkoušení bez známek stresu. Na začátku zkoušky by se hodnota pH zkušební vody měla pohybovat mezi 6 a 9 a její celková tvrdost by neměla být vyšší než 400 mg/l $CaCO_3$. V případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, měla by však být použita voda nižší tvrdosti (a proto v této situaci nelze použít Elendtovo médium M4). V průběhu celé studie by měl být užíván stejný typ vody. Charakteristiky jakosti vody uvedené v dodatku 4 by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně, nebo pokud existuje podezření, že mohlo dojít k podstatné změně těchto vlastností.

Zásobní roztoky – obohacené sedimenty

16. Obohacené sedimenty zvolené koncentrace se obvykle připraví přidáním roztoku zkoušené chemické látky přímo do sedimentu. Zásobní roztok zkoušené chemické látky rozpuštěné v deionizované vodě se smísí s přísadami doplněným sedimentem pomocí kroužívé míchačky, míchačky krmiv nebo ručním smícháním. Je-li zkoušená látka špatně rozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu). Tento roztok se pak smísí s 10 g jemného křemičitého písku na jednu zkušební nádobu. Rozpouštědlo se nechá odpařit a musí být zcela odstraněno z písku, písek se pak smísí s vhodným množstvím usazenin na jednotlivé zkušební kádinky. K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené chemické látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Je třeba mít na paměti, že při přípravě sedimentu je nutno zohlednit písek ze zkoušené chemické látky a směsi písku (tj. při přípravě sedimentu by proto mělo být použito menší množství písku). Je třeba dbát, aby zkoušená látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozložena. Pokud je to nutné, lze analyzovat dílčí vzorky za účelem stanovení stupně homogenity.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

17. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet larev v nádrži. Jsou popsána uspořádání pro odhad koncentrace vyvolávající účinek EC, pro odhad NOEC a pro provedení limitní zkoušky.

Uspořádání pro regresní analýzu

18. Koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. EC_{15}, EC_{50}) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Obecně platí, že přesnost, a zejména platnost, s níž lze provést odhady koncentrace vyvolávající účinek (EC_x), se zvýší, pokud se daná koncentrace vyvolávající účinek nachází v rozmezí zkoušených koncentrací. Je třeba se vyhnout extrapolaci hluboko pod nejnižší pozitivní koncentrací nebo přesahující nejvyšší koncentraci. Předběžná orientační zkouška je užitečná pro výběr rozsahu koncentrací, které mají být použity (viz odstavec 27).

▼M4

19. V případě, že EC_x je třeba odhadnout, je třeba zkoušku provést alespoň v pěti koncentracích a třech opakováních pro každou koncentraci. V každém případě je vhodné, aby byly užity dostatečné zkušební koncentrace umožňující dobrý odhad modelu. Faktor mezi koncentracemi nesmí být větší než 2 (výjimku lze učinit v případech, kdy má křivka závislosti odezvy na dávce malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit, pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s různými odezvami. Zvýšení počtu opakování nebo snížení velikosti zkušebních koncentrací obvykle vede k zúžení intervalu spolehlivosti zkoušky. Pro odhad desetidenního přežití a růstu larev jsou nutná další opakování.

Uspořádání odhadu NOEC/LOEC

20. Pro odhad LOEC nebo NOEC se použije pět zkušebních koncentrací s nejméně čtyřmi opakováními a faktor mezi koncentracemi by neměl být vyšší než 2. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). Pro rychlost vývoje je zpravidla vhodné použít analýzu rozptylu (ANOVA) jako například Dunnettův nebo Williamsův test (17, 18, 19, 20). Pro procento vylíhlých jedinců lze použít Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test.

Limitní zkouška

21. Limitní zkouška může být provedena (jedna zkušební koncentrace a kontrola), pokud nebyl zjištěn žádný dopad při předběžné orientační zkoušce. Účelem limitní zkoušky je provést zkoušku při dostatečně vysoké koncentraci umožňující osobám s rozhodovací pravomocí vyloučit možné toxické účinky zkoušené chemické látky a limit je stanoven v takové koncentraci, jejíž výskyt se v žádném případě nepředpokládá. Doporučená koncentrace je 1 000 mg/kg (sušiny). Obvykle je pro expozici i kontrolu zapotřebí alespoň šesti opakování. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). S metrickou reakcí (rychlost vývoje a hmotnost), je t-test vhodnou statistickou metodou, pokud údaje splňují požadavky tohoto testu (normalita, homogenní rozptyly). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů nebo neparametrický test, jako je například Wilcoxon-Mann-Whitneyův test. Pro procento vylíhlých jedinců je vhodný Fisherův exaktní test.

POSTUP

Podmínky expozice

Příprava systému obohacený sediment–voda

22. Pro aplikaci zkoušené chemické látky se doporučuje postup vmíchání popsaný ve zkušební metodě C.8: Toxicita pro žížaly (14). Obohacené sedimenty se umístí do nádob a přidá se voda nad sediment tak, aby vznikl objemový poměr vody a sedimentu 1:4 (viz odstavce 11 a 15). Hloubka vrstvy sedimentu by se měla pohybovat v rozmezí od 1,5 do 3 cm. Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije, a disk se bezprostředně poté vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení.

23. Zkušební nádoby se přikryjí (například skleněnými víčky). Pokud je to nutné, v průběhu studie se hladina vody doplní na původní objem s cílem kompenzovat odpařování vody. K tomuto účelu by měla být použita destilovaná nebo deionizovaná voda, aby se zabránilo hromadění solí.

▼M4

Stabilizace

24. Jakmile je připraven obohacený sediment s vodou nad sedimentem, je žádoucí umožnit rozdělení zkoušené chemické látky z vodné fáze do sedimentu (3, 4, 6, 13). To by se mělo provádět pokud možno za stejných podmínek z hlediska teploty a provzdušňování, které byly použity při zkoušce. Vhodná rovnovážná doba je specifická pro konkrétní sediment a chemickou látku a může se pohybovat v řádu hodin až dní, zřídka až několika týdnů (4–5 týdnů). Vzhledem k tomu, že tato doba by umožnila rozklad mnoha chemických látek, není očekávána rovnováha, ale doporučuje se doba do ustavení rovnováhy v trvání 48 hodin. Na konci této další doby do ustavení rovnováhy by měla být změřena koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, v kapilární vodě a v sedimentu, a to nejméně při nejvyšší koncentraci a při jedné nižší koncentraci (viz odstavec 38). Tato analytická stanovení zkoušené chemické látky umožňují výpočet hmotnostní bilance a vyjádření výsledků na základě naměřených koncentrací.

Přidání zkušebních organismů

25. Čtyři až pět dnů před přidáním zkušebních organismů do zkušebních nádob by měly být z kultur odebrány shluky vajíček a umístěny do malých nádob do kultivačního média. Lze použít starší médium ze zásobní kultury nebo čerstvě připravené médium. Pokud je použito čerstvé médium, mělo by být do kultivačního média přidáno malé množství potravy, např. zelené řasy a/nebo několik kapek filtrátu z jemně mleté suspenze vločkového krmiva pro ryby (viz dodatek 2). Měly by být použity pouze čerstvě nakladené shluky vajíček. Za normálních okolností se larvy začínají líhnout několik dní po nakladení vajíček (2 až 3 dny u *Chironomus riparius* při 20 °C a 1 až 4 dny u *Chironomus tentans* při 23 °C a *Chironomus yoshimatui* při 25 °C) a během larválního vývoje se vystřídají čtyři instary, z nichž každý trvá 4–8 dnů. Při zkoušce se použijí larvy prvního instarového stadia (2–3 nebo 1–4 dnů po vylíhnutí). Instar pakomárů lze případně zkontrolovat pomocí šířky hlavové kapsuly (6).

26. Dvacet larev prvního instaru se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících obohacený sediment a vodu. Provzdušňování vody je nutné ukončit při přidání larev do zkušebních nádob a znovu ho zahájit nejdříve po uplynutí dalších 24 hodin po přidání larev (viz odstavce 25 a 32). Podle použitého uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev užitý na jednu koncentraci minimálně 60 pro odhad koncentrace vyvolávající účinek a 80 pro stanovení NOEC.

Zkušební koncentrace

27. Orientační zkouška může být užitečná pro stanovení rozsahu koncentrací pro vlastní zkoušku. K tomuto účelu jsou pakomáři exponováni řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. S cílem zajistit stejnou hustotu povrchu na jednoho pakomára, která má být užita pro vlastní zkoušku, se pakomáři vystaví jednotlivým koncentracím zkoušené chemické látky po dobu, která umožňuje odhad vhodných zkušebních koncentrací; opakování nejsou vyžadována.

28. Zkušební koncentrace pro vlastní zkoušku jsou stanoveny podle výsledku zjištění předběžné orientační zkoušky. Mělo by být vybráno a použito nejméně pět koncentrací v souladu s popisem uvedeným v odstavcích 18 až 20.

▼M4

Kontroly

29. Při zkoušce se použijí kontrolní nádoby bez zkoušené chemické látky, avšak obsahující sediment, s příslušným počtem opakování (viz odstavce 19–20). Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky použito rozpouštědlo (viz odstavec 16), bude přidána kontrola rozpouštědla v sedimentu.

Zkušební zařízení

30. Užívají se statické systémy. Ve výjimečných případech, jako například tehdy, pokud je specifikace kvality vody nevhodná pro růst zkušebního organismu nebo ovlivňuje chemickou rovnováhu (např. přílišný pokles úrovně rozpuštěného kyslíku, přílišné zvýšení koncentrace exkrementů nebo výluh minerálů ze sedimentů, který ovlivňuje pH a/nebo tvrdost vody) lze použít semistatické nebo průtokové systémy s přerušovanou nebo kontinuální obnovou vody nad sedimentem. Zpravidla však budou postačující a vhodnější jiné metody zvýšení jakosti vody nad sedimentem, jako je například provzdušňování.

Krmení

31. Larvy je třeba krmit optimálně denně nebo nejméně třikrát týdně. Jako dostatečná dávka pro mladé larvy po dobu prvních 10 dnů se jeví krmivo pro ryby (suspenze ve vodě nebo jemně rozmělněné krmivo, např. Tetra-Min nebo Tetra-Phyll, viz podrobnosti v dodatku 2) v množství 0,25 až 0,5 mg (0,35 až 0,5 mg pro *C. yoshimatui*) na larvu za den. Starší larvy mohou potřebovat o něco větší množství potravy: po zbývající dobu zkoušky by mělo dostačovat 0,5–1 mg na larvu denně. U všech expozic by se měl snížit přísun potravy a mělo by se kontrolovat, zda dochází k růstu plísní nebo je pozorována mortalita. Pokud není možné růst plísní zastavit, je nutno zkoušku opakovat. Při testování silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo látek s kovalentní vazbou na sediment lze dávku potravy nezbytnou pro zajištění přežití a přirozeného růstu organismů přidat do přísadami doplněného sedimentu před fází stabilizace. V takovém případě je nutno místo krmiva pro ryby použít rostlinný materiál, například přídavek 0,5 % (sušiny) jemně mletých listů např. kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo jiného rostlinného materiálu (*Cerophylu* nebo alfa-celulózy).

Inkubační podmínky

32. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách se mírně provzdušňuje v optimálním případě 24 hodin po přidání larev a je sledována po celou dobu zkoušky (je třeba dbát, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 procent ASV). Provzdušňování se provádí pomocí skleněné Pasteurovy pipety upevněné 2–3 cm nad vrstvou sedimentu (tj. jedna nebo několik bublin/s). Při zkoušení těkavých chemických látek lze zvolit možnost systém sediment-voda neprovzdušňovat.

33. Zkouška se provádí při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C). Doporučená teplota pro *C. tentans* je 23 °C a pro *C. yoshimatui* 25 °C (± 2 °C). Fotoperioda je 16 hodin a intenzita světla by měla být 500 až 1 000 lux.

▼M4

Trvání expozice

34. Expozice je zahájena přidáním larev do obohacených a kontrolních nádob. Maximální délka trvání expozice je 28 dnů pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dnů pro *C. tentans*. Pokud se pakomáři vylíhnou dříve, lze zkoušku ukončit po uplynutí nejméně pěti dnů od vylíhnutí posledního dospělce v kontrolní nádobě.

Pozorování

Líhnutí

35. Určí se čas potřebný pro vývoj a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

36. Zkušební nádoby se kontrolují alespoň třikrát týdně s cílem vizuálně posoudit jakékoli neobvyklé chování (např. opouštění sedimentu, neobvyklé plavání) ve srovnání s kontrolními nádobami. Během období předpokládaného líhnutí je nutné denně počítat vylíhlé pakomáry. Pohlaví a počet plně vylíhlých pakomárů se denně zaznamenávají. Po identifikaci se pakomáři z nádob odstraní. Veškeré shluky vajíček nakladené před ukončením testu se zaznamenají a pak se odstraní, aby se zabránilo opětovnému zavlečení larev do sedimentu. Zaznamená se rovněž počet viditelných kukel, které se dosud nevylíhly. Pokyny pro měření líhnutí jsou uvedeny v dodatku 5.

Růst a přežívání

37. Pokud je nutné uvést údaje o desetidenním přežití a růstu larev, je třeba na počátku zkoušky přidat další zkušební nádoby tak, aby je bylo možné následně použít. Sediment z těchto dalších nádob se proseje za použití síta o velikosti 250 μm, které udrží larvy. Kritéria uhynutí jsou nepohyblivost nebo nedostatečná reakce na mechanické podněty. Larvy, které nejsou nalezeny, by měly být rovněž považovány za uhynulé (larvy uhynulé na počátku zkoušky mohly být již rozloženy mikroby). Stanoví se hmotnost sušiny (prosté popelovin) larev, které přežily, na zkušební nádobu a vypočte se průměrná individuální hmotnost sušiny na nádobu. Je vhodné určit, do kterého instaru přežívající larvy patří, pomocí změření šířky hlavové kapsuly každého jedince.

Analytická měření

Koncentrace zkoušené chemické látky

38. Před zahájením zkoušky (tj. přidáním larev), se alespoň z jedné nádoby na každou expozici odstraní souhrnné vzorky sedimentu za účelem analytického stanovení koncentrace zkoušené chemické látky v sedimentu. Doporučuje se, aby byly analyzovány minimálně vzorky vody nad sedimentem, kapilární vody a sedimentu na počátku (viz bod 24) a na konci zkoušky při nejvyšší koncentraci a jedné nižší koncentraci. Tato stanovení koncentrace zkoušené chemické látky poskytují informace o chování/distribuci zkoušené chemické látky v systému voda–sediment.

39. Při provádění průběžných měření (např. 7. den) a v případě, že jsou pro analýzu zapotřebí rozsáhlé vzorky, které nelze ze zkušebních nádob odebrat bez dopadu na zkušební systém, je potřeba provést analytická stanovení na vzorcích z dalších zkušebních nádob, s nimiž bylo zacházeno stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), ale nebyly použity pro biologická pozorování.

▼M4

40. Doporučeným postupem izolace intersticiální vody je odstřeďování např. při 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minut. Neadsorbuje-li se však zkoušená látka prokazatelně na filtry, je přijatelná i filtrace. V některých případech může být nemožné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě vzhledem k tomu, že vzorek je příliš malý.

Fyzikálně-chemické parametry

41. pH a teplotu ve zkušebních nádobách je nutno měřit vhodným způsobem (viz odstavec 10). Tvrdost a obsah amoniaku by měly být měřeny v kontrolních nádobách a v jedné zkušební nádobě při nejvyšší koncentraci na počátku zkoušky a na jejím konci.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené chemické látky na rychlost vývoje a celkový počet plně vylíhlých samců a samic, pakomárů nebo v případě desetidenní zkoušky účinky na přežití a hmotnost larev. Pokud nejsou k dispozici žádné údaje o statistických rozdílech citlivosti mezi oběma pohlavími, lze výsledky pro samce a pro samice sloučit pro účely statistické analýzy. Rozdíly v citlivosti mezi pohlavími lze statisticky posoudit např. pomocí tabulkového χ^2 – r × 2 testu. Je-li vyžadováno stanovení přežití larev a průměru individuální sušiny na jednu nádobu, je nutno tak učinit po 10 dnech.

43. Koncentrace s pozorovanými účinky vyjádřené a vztažené k sušině se vypočtou přednostně na základě naměřených koncentrací sedimentu na počátku zkoušky (viz odstavec 38).

44. Pro výpočet bodového odhadu EC_{50} nebo jakékoli jiné hodnoty EC_x lze jako skutečné opakování použít statistiku na jednu nádobu. Při výpočtu intervalu spolehlivosti pro každý EC_x je nutno zohlednit variabilitu mezi jednotlivými nádobami, případně prokázat, že tato variabilita je tak nízká, že ji lze ignorovat. Je-li u modelu užita metoda nejmenších čtverců, je nutné u statistik jednotlivých nádob uplatnit transformaci za účelem homogenity rozptylu. Hodnoty EC_x je však třeba vypočítat až poté, co je reakce převedena zpět na původní hodnotu.

45. Pokud je cílem statistické analýzy stanovení hodnoty NOEC/LOEC testováním hypotéz, je nutno vzít v úvahu variabilitu mezi nádobami, například pomocí analýzy rozptylu ANOVA. Případně mohou být vhodnější robustnější testy (21) v případě, že dojde k porušení předpokladů obvykle užitých při analýze ANOVA.

Procento vylíhlých jedinců

46. Procenta vylíhlých jedinců jsou binární údaje a lze je analyzovat s použitím postupně klesajícího Cochranova-Armitageova testu, který předpokládá monotónní odezvu na dávku, a údaje jsou konzistentní s tímto očekáváním. V opačném případě lze použít Fisherův exaktní test nebo Mantelův-Haenszelův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí p-hodnot. Pokud existují důkazy o větší variabilitě mezi replikacemi ve stejné koncentraci, pak by binomické rozdělení (často uváděné jako „extra-binomická“ variabilita) nasvědčovalo tomu, že je nutno použít robustní Cochranův-Armitageův test nebo Fisherův exaktní test, jak je navrhováno v odstavci (21).

▼M4

Určí se součet pakomárů vylíhlých v jedné nádobě ne a vydělí se počtem vložených larev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = procento vylíhlých jedinců,

n_e = počet pakomárů vylíhlých v nádobě,

n_a = počet larev nasazených do nádoby.

47. Nejvhodnější alternativou pro rozsáhlé vzorky s extra binomickou variací je pojmout procento vylíhlých jedinců jako kontinuální odezvu a použít postupy, jako je například Williamsův test, pokud existuje předpoklad monotónní odezvy na dávku a je konzistentní s těmito daty ER. V případě nemonotónní odezvy by byl vhodný Dunnettův test. Rozsáhlý vzorek je zde definován situací, při níž jak počet vylíhlých jedinců, tak počet nevylíhlých jedinců přesáhnou v jednom duplikátním vzorku (nádobě) hodnotu pět.

48. Při použití metody ANOVA je nutno hodnoty ER nejprve transformovat (například druhou odmocninou funkce arcsin) nebo transformací podle Freemana-Tukeyho s cílem získat přibližné normální rozdělení údajů a vyrovnat odchylky. Při použití absolutních frekvencí lze použít test dle Cochrana-Armitage, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí), nebo Mantelův-Haenszelův test. Transformace funkcí √arcsin se vypočte pomocí převrácené hodnoty sinu ($\sin^{-1}$) z odmocniny ER.

49. Pro procento vylíhlých jedinců se hodnoty EC_x vypočtou pomocí regresní analýzy (nebo např. pomocí modelu probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčního softwaru atd.). V případě selhání regresní analýzy (např. v případě méně než dvou koncentrací s parciálními odezvami) se použijí další neparametrické metody, jako je například klouzavý průměr nebo prostá interpolace.

Rychlost vývoje

50. Průměrná doba vývoje představuje průměrné časové rozpětí mezi nasazením larev (den 0 zkoušky) a vylíhnutím experimentální kohorty pakomárů. (Pro výpočet skutečné doby vývoje by mělo být zohledněno stáří larev v okamžiku nasazení. Rychlost vývoje je převrácenou hodnotou doby vývoje (jednotka: 1/den) a představuje tu část larválního vývoje, která se odehraje za den. Rychlost vývoje je z hlediska hodnocení těchto studií toxicity sedimentů preferována před dobou vývoje vzhledem k její nižší variabilitě, vyšší homogenitě a vyšší blízkosti normálnímu rozdělení. Z tohoto důvodu mohou být použity silné parametrické zkušební postupy pro rychlost vývoje spíše než pro dobu vývoje. Pro rychlost vývoje jako kontinuální odezvu lze hodnoty EC_x stanovit odhadem pomocí regresní analýzy (např. (23), (24)).

51. U následujících statistických testů se má za to, že počet pakomárů pozorovaných v inspekčním dni × se vylíhl v průměru časového intervalu mezi dnem x a dnem x – l (l = délka intervalu mezi pozorováními, obvykle 1 den). Průměrná rychlost vývoje na nádobu (x) se vypočte podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kde:

$\bar{x}$: střední rychlost vývoje v kádince,

i: index intervalu mezi pozorováními,

m: počet všech intervalů mezi pozorováními,

f_i: počet vylíhlých jedinců během daného intervalu i mezi pozorováními,

n_e: počet vylíhlých jedinců celkem na konci pokusu $\sum f_i$,

x: rychlost vývoje larev vylíhlých v intervalu i,

$$x_i = \frac{1}{\left(den_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

kde:

den_i: den pozorování (ve dnech od aplikace),

l_i: délka intervalu mezi pozorováními (ve dnech, obvykle 1 den).

Protokol o zkoušce

52. Protokol o zkoušce musí obsahovat minimálně tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povahu a případně fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpustnost ve vodě, tlak par, rozdělovací koeficient v půdě (případně v sedimentu), stabilita ve vodě atd.,

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky.

Testovací druh:

— užitá pokusná zvířata: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky množení,

— informace o nakládání se shluky vajíček a s larvami,

— stáří testovaných zvířat po nasazení do zkušebních nádob.

Zkušební podmínky:

— použitý sediment, tj. přírodní nebo přísadami doplněný sediment,

— u přírodního sedimentu lokalita a popis místa odběru sedimentu, pokud možno včetně dřívější kontaminace, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíku, poměr C/N a zrnitost (je-li to vhodné),

— příprava přísadami doplněného sedimentu: složky a charakteristiky (obsah organického uhlíku, pH, vlhkost, atd. na začátku zkoušky),

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, vodivost, tvrdost, atd. na začátku zkoušky),

— hloubka sedimentu a vody nad sedimentem,

— objem vody nad sedimentem a kapilární vody, hmotnost vlhkého sedimentu s kapilární vodou a bez ní,

▼M4

— zkušební nádoby (materiál a rozměry),

— způsob vmíchávání do sedimentu, použité zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a případné použití rozpouštědla,

— stabilizace rovnovážné fáze obohaceného systému sediment/voda: trvání a podmínky,

— inkubační podmínky: teplota, cyklus a intenzita světla, provzdušňování (frekvence a intenzita),

— podrobnější informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení.

Výsledky:

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušební nádobě,

— jakost vody ve zkušebních nádobách, tj. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, tvrdost a amoniak,

— případné nahrazování odpařené zkušební vody,

— počet vylíhlých samců a samic pakomárů na nádobu za den,

— počet larev, z nichž se nevylíhli dospělci, na nádobu,

— průměrná individuální hmotnost sušiny larev na nádobu a případně na instar,

— procento vylíhlých jedinců na duplikátní vzorek a zkušební koncentraci (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— průměrná rychlost vývoje plně vylíhlých pakomárů na duplikátní vzorek a aplikované množství (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— odhady koncových bodů toxicity, např. ECx (a související intervaly spolehlivosti), NOEC a/nebo LOEC a statistické metody použité k jejich stanovení,

— diskuse o výsledcích včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA:

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Prosinec 1997.

▼M4

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Zkušební metoda C.8 této přílohy, Toxicita pro žížaly.

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Přísadami doplněný sediment nebo rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment je směs materiálů užitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Intersticiální voda nebo kapilární voda je voda zabírající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Obohacený sediment je sediment, do něhož byla přidána zkoušená látka.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 2

Doporučení pro kultivaci kultury *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* lze chovat v krystalizačních miskách nebo ve větších nádobách. Jemný křemičitý písek se rozprostře po dně nádoby v tenké vrstvě silné 5 až 10 mm. Bylo prokázáno, že substrátem vhodným jako podklad je také křemelina (např. Merck, čl. 8117), (dostačující je tenčí vrstva silná jen několik málo mm). Následně se přidá několikacentimetrová vrstva vhodné vody. Objem vody by se měl podle potřeby doplňovat s cílem nahradit ztráty vzniklé odpařováním a zabránit vysychání. Vodu lze v případě potřeby vyměnit. Je třeba zajistit mírné provzdušňování. Nádoby, v nichž jsou larvy chovány, by měly být umístěny ve vhodné kleci, která zabrání úniku líhnoucích se dospělců. Tato klec by měla být dostatečně velká, aby umožňovala rojení vylíhlých dospělců, jinak by nemuselo dojít k jejich páření (minimum je přibližně 30 × 30 × 30 cm).

2. Klece by měly být umístěny při pokojové teplotě nebo v místnosti s konstantní teplotou 20 ± 2 °C s fotoperiodou 16 hodin světlo (intenzity přibližně 1 000 lux) a 8 hodin tma. Bylo zjištěno, že vzdušná vlhkost nižší než 60 % RH může bránit rozmnožování.

Ředicí voda

3. Lze použít jakoukoli vhodnou přírodní nebo syntetickou vodu. Zpravidla se užívá studniční voda, odchlorovaná vodovodní voda a umělá média (např. Elendtovo médium „M4“ nebo „M7“, viz níže). Vodu je před použitím nutno provzdušnit. Je-li to nutné, lze kultivační vodu obnovit opatrným odlitím nebo odčerpáním použité vody z kultivačních nádob tak, aby nedošlo k poškození schránek larev.

Krmení larev

4. Larvy rodu *Chironomus* se krmí vločkovým krmivem pro ryby (Tetra-Min(®, Tetra Phyll® nebo jiná podobná značka patentovaného krmiva pro ryby), v množství přibližně 250 mg na nádobu a den. Potravu lze aplikovat v podobě suchého mletého prášku nebo v podobě suspenze ve vodě: 1,0 g vločkového krmiva se přidá do 20 ml ředicí vody a vytvoří se homogenní směs. Tento přípravek lze dodávat v množství přibližně 5 ml na nádobu na den (před použitím protřepat). Starším larvám lze přidat více krmiva.

5. Krmení se upraví podle kvality vody. V případě, že se kultivační médium „zakalí“, je třeba krmnou dávku snížit. Přidávání potravy je nutno pečlivě sledovat. Příliš malé množství krmiva způsobí, že larvy opouštějí sediment a vznášejí se ve vodním sloupci, a příliš mnoho krmiva způsobí zvýšenou mikrobiální činnost a pokles koncentrace kyslíku. Obojí může způsobit snížení rychlosti růstu.

6. Do nových kultivačních nádob mohou být přidány i buňky zelených řas (např. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Krmení vylíhlých dospělců

7. Někteří experimentátoři se domnívají, že jako potrava vylíhlých dospělců může sloužit vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy.

▼M4

Líhnutí

8. Dospělci se začnou v chovných nádobách líhnout při teplotě 20 ± 2 °C přibližně po 13–15 dnech. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

Shluky vajíček

9. Jakmile se ve snubní komůrce nacházejí dospělci, je třeba třikrát týdně kontrolovat všechny reprodukční nádoby, zda se v nich nacházejí shluky vajíček spojené želatinózní hmotou. Pokud se zde shluky vajíček nacházejí, je nutno je opatrně odstranit a přemístit do malé misky obsahující vzorek chovného vodního prostředí. Shluky vajíček se užijí pro založení nové nádoby s kulturou (např. 2–4 shluky vajíček na nádobu) nebo se užijí pro zkoušky toxicity.

10. Larvy prvního instarového stadia by se měly vylíhnout za 2–3 dny.

Zakládání nových kultivačních nádob

11. Jakmile jsou kultury založeny, mělo by být možné zakládat nové nádoby s kulturami larev jednou týdně nebo méně často v závislosti na zkušebních požadavcích a odstraňovat starší nádoby po vylíhnutí dospělců. Pomocí tohoto systému se zajistí pravidelné dodávky dospělců s minimální potřebou dohledu.

Příprava zkušebních roztoků „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) popsal médium „M4“. Médium „M7“ se připraví obdobně jako médium „M4“ s výjimkou látek uvedených v tabulce 1, u nichž jsou koncentrace u „M7“ čtyřikrát nižší než u „M4“. Připravuje se publikace o médiu „M7“ (Elendt, osobní sdělení). Podle Elendta a Biase (1990) by se zkušební roztok neměl připravovat pro koncentrace $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 vzhledem k tomu, že nejsou pro přípravu zásobních roztoků vyhovující.

Příprava média „M7“

13. Každý zásobní roztok (I) se připraví samostatně a z těchto zásobních roztoků (I) se pak připraví kombinovaný zásobní roztok (II) (viz tabulka 1). Médium „M7“ se připraví přidáním 50 ml kombinovaného zásobního roztoku (II) a množství zásobního roztoku jednotlivých makroživin, které jsou uvedeny v tabulce 2, do 1 litru deionizované vody. Připraví se vitaminový zásobní roztok přidáním tří vitaminů do deionizované vody, jak je uvedeno v tabulce 3, a 0,1 ml kombinovaného vitaminového zásobního roztoku se přidá do výsledného média „M7“ krátce před použitím. (Vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých alikvotních dílech.) Médium se provzdušní a stabilizuje.

LITERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabulka 1

Zásobní roztoky stopových prvků pro médium M4 a M7

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tyto chemické látky se u M4 a M7 liší, jak je uvedeno výše.
(2) Tyto roztoky se připravují samostatně, spojí se a ihned se zpracují v autoklávu.

Tabulka 2

Zásobní roztoky makroživin pro médium M4 a M7

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství zásobních roztoků makroživin přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabulka 3

Vitaminový zásobní roztok pro médium M4 a M7. Všechny tři vitaminové roztoky se smísí do jediného vitaminového zásobního roztoku

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství vitaminového zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Dodatek 3

PŘÍPRAVA PŘÍSADAMI DOPLNĚNÉHO SEDIMENTU

Složení sedimentu

Složení přísadami doplněného sedimentu by mělo být následující:

Složka	Charakteristika	% sušiny sedimentu
Rašelina:	rašelina mechu Sphagnum s pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená na vzduchu	4–5
Křemičitý písek	velikost zrn: > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm	75–76
Kaolinitický jíl	obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	upraven přidáním rašeliny a písku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý	0,05–0,1
Voda	vodivost ≤ 10 μS/cm	30–50

Příprava

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele se na jemný prášek. Připraví se suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě s použitím vysoce výkonného homogenizačního zařízení. pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se kondicionuje po dobu nejméně dvou dní za mírného promíchávání při 20 ±2° C za účelem stabilizace pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by se mělo rovnat 6,0 ± 0,5. Pak se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a kaolín) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 procent sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti je opět upraveno pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Následně se doporučuje před použitím pro zkoušku toxicity pro pakomáry přísadami doplněný sediment kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následné zkoušce.

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Přísadami doplněný (mokrý) sediment by neměl být před použitím ve zkoušce skladován. Měl by být použit ihned po uplynutí sedmidenního období kondicionování, kterým končí jeho příprava.

LITERATURA:

Kapitola C.8 této přílohy. Toxicita pro žížaly.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Chemické charakteristiky přípustné ředicí vody

Látka	Koncentrace
Částice tuhé	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdost jako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organické fosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

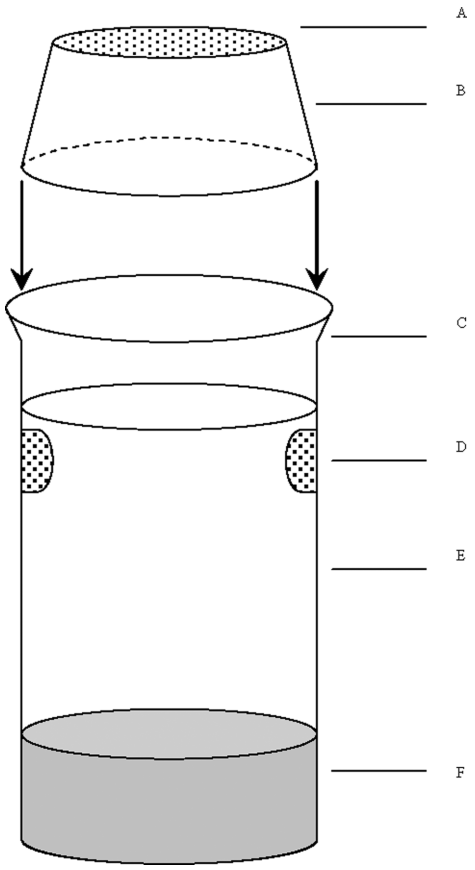
(*) Je však třeba poznamenat, že v případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, by měla být použita voda nižší tvrdosti (a proto v této situaci nesmí být použito Elendtovo médium M4).

▼M4

Dodatek 5

Pokyny pro monitorování líhnutí larev pakomárů

Na zkušební kádinky jsou umístěny výletové pasti. Tyto pasti jsou potřebné od 20. dne až do konce zkoušky. Níže je nakreslen příklad používané pasti:



A: nylonová síťka

B: plastový kryt

C: kádinka bez zobáčku

D: otvory na výměnu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.28 TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT–VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 219 (2004). Tato zkušební metoda je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice larev sladkovodních pakomárů *Chironomus* sp. žijících v sedimentu chemickým látkám. Je založena především na pokynu BBA s užitím zkušebního systému sediment-voda s umělou půdou a scénáře expozice vodního sloupce (1). Zohledňuje rovněž stávající protokoly o zkouškách toxicity pro *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, které byly vyvinuty v Evropě a Severní Americe a (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) a zkoušeny v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (1, 6, 9). Lze užít rovněž další dobře zdokumentované druhy pakomárů, jako například *Chironomus yoshimatsui* (10, 11).

2. Scénář expozice užitý při této zkušební metodě spočívá v obohacení vody. Výběr vhodného scénáře expozice závisí na zamýšleném použití testu. Účelem scénáře expozice vody, který zahrnuje obohacení vodního sloupce, je simulovat rozprášení pesticidního postřiku a zahrnuje počáteční maximální koncentrace v kapilární vodě. Je vhodný také pro jiné druhy expozic (včetně úniků chemikálií) s výjimkou akumulačních procesů, jejichž délka přesahuje trvání zkušebního období.

3. Látky, které je třeba testovat z hlediska organismů žijících v sedimentu, v této složce obvykle přetrvávají po dlouhá časová období. Expozici organismů žijících v sedimentu lze zajistit celou řadou možných cest. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovým toxickým účinkům, je závislá na fyzikálně chemických vlastnostech dotčené chemické látky. V případě silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo pro chemické látky s kovalentní vazbou na sediment může být významnou expoziční cestou požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity vysoce lipofilních látek, lze zvážit užití potravy přidané do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky. Aby bylo možné zohlednit všechny potenciální způsoby expozice, zaměřuje se tato zkušební metoda na dlouhodobou expozici. Délka trvání zkoušky se pohybuje v rozmezí 20–28 dní pro *C. riparius* and *C. yoshimatsui* a 28–65 dní pro *C. tentans*. Pokud jsou pro konkrétní účel, například pro studium účinků nestabilní chemické látky, potřebné krátkodobé údaje, mohou být další duplikátní vzorky po deseti dnech odstraněny.

4. Měřené výsledné účinky se rovnají celkovému počtu vylíhlých dospělců a času do vylíhnutí. Pokud jsou nezbytné další krátkodobé údaje, doporučuje se provádět měření přežití a růstu larev až po uplynutí desetidenního období, podle potřeby s využitím dalších duplikátních vzorků.

5. Doporučuje se použití přísadami doplněného sedimentu. Přísadami doplněný sediment má několik výhod oproti přírodním sedimentům:

— jeho experimentální variabilita je snížena, protože tvoří reprodukovatelnou „standardizovanou matrici“, a odpadá potřeba hledat zdroje nekontaminovaného čistého sedimentu,

— zkoušky lze zahájit kdykoliv, aniž by bylo nutné čelit sezónním výkyvům zkušebního sedimentu, a sediment není třeba předem upravit s cílem odstranit původní živočichy; užití přísadami doplněného sedimentu také snižuje náklady spojené s terénním shromažďováním dostatečného množství sedimentu pro rutinní testování,

▼M4

— užití přísadami doplněného sedimentu umožňuje porovnání toxicity a odpovídající řazení látek; údaje o toxicitě ze zkoušek s přírodními a umělými sedimenty byly pro více látek porovnatelné (2).

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Larvy pakomárů jsou během prvního instaru vystaveny koncentračnímu rozmezí zkoušené chemické látky v systému sediment-voda. Zkouška začíná tím, že se larvy prvního instaru nasadí do zkušebních kádinek obsahujících systém sediment-voda a voda se následně obohatí zkoušenou látkou. Na konci zkoušky se měří počet vylíhnutí a rychlost vývoje pakomárů. V případě potřeby lze po 10 dnech měřit rovněž přežití larev a jejich hmotnost (v případě potřeby lze použít další duplikátní vzorky). Tyto údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila x% snížení líhnutí nebo přežití či růstu larev (např. EC_{15}, EC_{50}, atd.), nebo s využitím testování statistických hypotéz pro stanovení NOEC/LOEC. Posledně uvedená metoda vyžaduje srovnání hodnoty účinku s kontrolními hodnotami pomocí statistických testů.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

8. Měla by být známa rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její tlak par, naměřená nebo vypočtená distribuce v sedimentu a stabilita ve vodě a sedimentu. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro kvantitativní stanovení zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, kapilární vodě a v sedimentu, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Užitečné informace zahrnují strukturní vzorec a čistotu zkoušené chemické látky. Užitečnou informací je rovněž chemický osud zkoušené chemické látky (např. zánik, abiotický a biotický rozklad atd.) Další návod pro zkoušení látek s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v odstavci (12).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Referenční chemické látky mohou být pravidelně kontrolovány pro ověření, že zkušební podmínky a protokol o zkoušce jsou spolehlivé. Příkladem referenčních toxických látek úspěšně použitých v mezilaboratorních zkouškách a validačních studiích jsou lindan, trifluralin, pentachlorfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1, 2, 5, 6, 13).

PLATNOST ZKOUŠKY

10. Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

— vylíhnutí v kontrolních nádobách musí být na konci zkoušky nejméně 70 % (1, 6),

— k líhnutí dospělců *C. riparius* and *C. yoshimatsui* v kontrolních nádobách by mělo dojít mezi 12. a 23. dnem po jejich zavedení do nádob; pro *C. tentans* je nutná doba 20–65 dnů,

— na konci zkoušky se v každé nádobě změří pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace kyslíku by měla činit alespoň 60 procent hodnoty nasycení vzduchem (ASV), při použité teplotě, a pH vody nad sedimentem by se mělo ve všech zkušebních nádobách pohybovat v rozmezí pH 6–9,

▼M4

— teplota vody by se neměla lišit o více než ± 1,0 °C. Teplota vody může být řízena v izotermální místnosti a v tomto případě by měla být teplota v místnosti ve vhodném časovém intervalu potvrzována.

POPIS METODY

Zkušební nádoby

11. Studie se provádí ve skleněných 600ml kádinkách o průměru 8 cm. Vhodné jsou i jiné nádoby, ale měly by zaručit odpovídající hloubku vody nad sedimentem a sedimentu. Plocha sedimentu by měla být dostatečná, aby poskytovala 2 až 3 cm^2 na larvu. Poměr hloubky sedimentu k hloubce vody nad sedimentem by měl být 1:4. Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkušebním systémem, by měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu (např. z teflonu).

Výběr druhů

12. Při zkoušce má být přednostně užito druhu *Chironomus riparius*. Vhodný je i druh *Chironomus tentans*, avšak hůře se s ním manipuluje a vyžaduje i delší trvání zkoušky. Lze užít rovněž druh *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o kultivačních metodách pro druh *Chironomus riparius* jsou uvedeny v dodatku 2. Informace o kultivačních podmínkách jsou k dispozici také pro jiné druhy, tj. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikace druhu musí být potvrzena před zkouškou, ale není vyžadována před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z domácí kultury.

Sediment

13. Doporučuje se přednostně užívat přísadami doplněný sediment (nazývaný rovněž rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment). Pokud se však použije přírodní sediment, je potřeba ho charakterizovat (alespoň pH, obsah organického uhlíku a doporučuje se i stanovení dalších parametrů, jako je poměr C/N a zrnitost) a měl by být prost veškerého znečištění a dalších organismů, které by mohly pakomárům konkurovat nebo je konzumovat. Doporučuje se také přírodní sediment před použitím při zkoušce toxicity pro pakomáry kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následující zkoušce. Pro použití v této zkoušce se doporučuje následující přísadami doplněný sediment založený na umělé půdě užité při zkušební metodě C.8 (14) (1, 15, 16):

a) 4–5 % (sušiny) rašeliny s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; ve formě prášku, jemně namletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená výhradně na vzduchu;

b) 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d) přidá se deionizovaná voda s cílem dosáhnout 30–50 % vlhkosti v konečné směsi;

e) přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíku v konečné směsi by měl být 2 % (± 0,5 %) a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c).

▼M4

14. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jednotlivé složky sedimentu by měly být kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické sloučeniny, organofosforové sloučeniny atd.). Příklad přípravy přísadami doplněného sedimentu je popsán v dodatku 3. Přijatelné je i míchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. vyplavování částic rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány.

Voda

15. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přípustné ředicí vody uvedeným v dodatcích 2 a 4. Jakákoli vhodná voda, přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda (viz příloha 2) nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako kultivační a zkušební voda, pokud v ní pakomáři přežijí po dobu kultivace a zkoušení bez známek stresu. Na začátku zkoušky by se hodnota pH zkušební vody měla pohybovat mezi 6 a 9 a její celková tvrdost by neměla být vyšší než 400 mg/l $CaCO_3$. V případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, měla by však být použita voda nižší tvrdosti (a proto se v této situaci nesmí použít Elendtovo médium M4). V průběhu celé studie by měl být užíván stejný typ vody. Charakteristiky jakosti vody uvedené v dodatku 4 by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně, nebo pokud existuje podezření, že mohlo dojít k podstatné změně těchto vlastností.

Zásobní roztoky – obohacená voda

16. Zkušební koncentrace se vypočtou na základě koncentrace vodního sloupce, tj. vody nad sedimentem. Zkušební roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připraveny ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně rozpuštěním zkoušené látky ve zřeďovací vodě. Použití rozpouštědel nebo dispergátorů může být v některých případech pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, ethylenglykol-monoethylether, ethylenglykol-dimethylether, dimethylformamid a triethylenglykol. Disperzní činidla, která mohou být použita, jsou Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Koncentrace solubilizačního činidla v konečném zkušebním médiu by měla být minimální (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) a měla by být u všech expozic stejná. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na larvy *Chironomidae*, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové chemické látky nepoužívat.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

17. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet larev v nádrži. Jsou popsána uspořádání pro odhad koncentrace vyvolávající účinek EC, odhad NOEC a pro provedení limitní zkoušky. Regresní analýze se dává přednost před testováním hypotéz.

Uspořádání pro regresní analýzu

18. Koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. EC_{15}, EC_{50}) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Obecně platí, že přesnost, a zejména platnost, s níž lze provést odhady koncentrace vyvolávající účinek (EC_x), se zvýší, pokud se daná koncentrace vyvolávající účinek

▼M4

nachází v rozmezí zkoušených koncentrací. Je třeba se vyhnout extrapolaci hluboko pod nejnižší pozitivní koncentrací nebo přesahující nejvyšší koncentraci. Předběžná orientační zkouška je užitečná pro výběr rozsahu koncentrací, které mají být použity (viz odstavec 27).

19. V případě, že ECx je třeba odhadnout, je třeba zkoušku provést alespoň v pěti koncentracích a třech opakováních pro každou koncentraci. V každém případě je vhodné, aby byly užity dostatečné zkušební koncentrace umožňující dobrý odhad modelu. Faktor mezi koncentracemi nesmí být větší než 2 (výjimku lze učinit v případech, kdy má křivka závislosti odezvy na dávce malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit, pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s různými odezvami. Zvýšení počtu opakování nebo zúžení rozsahu zkušebních koncentrací obvykle vede k zúžení intervalu spolehlivosti zkoušky. Pro odhad desetidenního přežití a růstu larev jsou nutná další opakování.

Uspořádání odhadu NOEC/LOEC

20. Pro odhad LOEC/NOEC se použije pět zkušebních koncentrací s nejméně čtyřmi opakováními a faktor mezi koncentracemi by neměl být vyšší než 2. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). Pro rychlost vývoje je zpravidla vhodné použít analýzu rozptylu (ANOVA), jako například Dunnettův nebo Williamsův test (17, 18, 19, 20). Pro procento vylíhlých jedinců lze použít Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test.

Limitní zkouška

21. Limitní zkouška může být provedena (jedna zkušební koncentrace a kontrola), pokud nebyl zjištěn žádný dopad při předběžné orientační zkoušce. Účelem limitní zkoušky je určit, že hodnota toxicity zkoušené látky je vyšší než zkoušený koncentrační limit. V této zkušební metodě nelze navrhnout doporučenou koncentraci: její stanovení je ponecháno na úsudku osob s rozhodovací pravomocí. Obvykle je pro expozici i kontrolu zapotřebí alespoň šesti opakování. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). S metrickou reakcí (rychlost vývoje a hmotnost), je t-test vhodnou statistickou metodou, pokud údaje splňují požadavky tohoto testu (normalita, homogenní rozptyly). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů nebo neparametrický test, jako je například Wilcoxon-Mann-Whitneyův test. Pro procento vylíhlých jedinců je vhodný Fisherův exaktní test.

POSTUP

Podmínky expozice

Příprava systému obohacená voda–sediment

22. Do zkušebních nádob se přidá vhodné množství přísadami doplněného sedimentu (viz odstavce 13–14 a dodatek 3) tak, aby tvořil vrstvu o hloubce nejméně 1,5 cm. Přidá se voda do hloubky 6 cm (viz odstavec 15). Poměr vrstvy sedimentu a hloubky vody by neměl překročit 1:4 a vrstva sedimentu by neměla být hlubší než 3 cm. Systém sediment–voda se před přidáním zkušebních organismů (viz odstavec 14 a dodatek 3). mírně provzdušňuje po dobu sedmi týdnů. Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije a disk se bezprostředně poté vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení.

▼M4

23. Zkušební nádoby se přikryjí (například skleněnými víčky). Pokud je to nutné, v průběhu studie se hladina vody doplní na původní objem s cílem kompenzovat odpařování vody. K tomuto účelu by měla být použita destilovaná nebo deionizovaná voda, aby se zabránilo hromadění solí.

Přidání zkušebních organismů

24. Čtyři až pět dnů před přidáním zkušebních organismů do zkušebních nádob by měly být z kultur odebrány shluky vajíček a umístěny do malých nádob do kultivačního média. Lze použít starší médium ze zásobní kultury nebo čerstvě připravené médium. Pokud je použito čerstvé médium, mělo by být do kultivačního média přidáno malé množství potravy, např. zelené řasy a/nebo několik kapek filtrátu z jemně mleté suspenze vločkového krmiva pro ryby (viz dodatek 2). Měly by být použity pouze čerstvě nakladené shluky vajíček. Za normálních okolností se larvy začínají líhnout několik dní po nakladení vajíček (2 až 3 dny u *Chironomus riparius* při 20 °C a 1 až 4 dny u *Chironomus tentans* při 23 °C a *Chironomus yoshimatui* při 25 °C) a během larválního vývoje se vystřídají čtyři instary, z nichž každý trvá 4–8 dnů. Při zkoušce se použijí larvy prvního instaru (2–3 nebo 1–4 dnů po vylíhnutí). Instar pakomárů lze případně zkontrolovat pomocí šířky hlavové kapsuly (6).

25. Dvacet larev prvního instaru se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících obohacený sediment a vodu. Provzdušňování vody je nutno ukončit při přidání larev do zkušebních nádob a znovu ho zahájit nejdříve po uplynutí dalších 24 hodin po přidání larev (viz odstavce 25 a 32). Podle užitého uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev užitý na jednu koncentraci minimálně 60 pro odhad koncentrace vyvolávající účinek a 80 pro stanovení NOEC.

26. Dvacet čtyři hodin po přidání larev se zkoušená látka vmísí do sloupce vody nad sedimentem a znovu se zavede mírné provzdušňování. Pod hladinou vody se pomocí pipety aplikují malé objemy roztoků zkoušené látky. Voda nad sedimentem se poté opatrně promíchá, aby se nerozrušil sediment.

Zkušební koncentrace

27. Orientační zkouška může být užitečná pro stanovení rozsahu koncentrací pro vlastní zkoušku. K tomuto účelu jsou pakomáři exponováni řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. S cílem zajistit stejnou hustotu povrchu na jednoho pakomára, která má být užita pro vlastní zkoušku, se pakomáři vystaví jednotlivým koncentracím zkoušené chemické látky po dobu, která umožňuje odhad vhodných zkušebních koncentrací; opakování nejsou vyžadována.

28. Zkušební koncentrace pro vlastní zkoušku jsou stanoveny podle výsledku zjištění předběžné orientační zkoušky. Mělo by být vybráno a použito nejméně pět koncentrací v souladu s popisem uvedeným v odstavcích 18 až 20.

Kontroly

29. Při zkoušce se použijí kontrolní nádoby bez zkoušené chemické látky, avšak obsahující sediment s příslušným počtem opakování (viz odstavce 19–20). Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky použito rozpouštědlo (viz odstavec 16), bude přidána kontrola rozpouštědla v sedimentu.

▼M4

Zkušební zařízení

30. Užívají se statické systémy. Ve výjimečných případech, jako například tehdy, pokud je specifikace kvality vody nevhodná pro růst zkušebního organismu nebo ovlivňuje chemickou rovnováhu (např. přílišný pokles úrovně rozpuštěného kyslíku, přílišné zvýšení koncentrace exkrementů nebo výluh minerálů ze sedimentů, který ovlivňuje pH a/nebo tvrdost vody), lze použít semistatické nebo průtokové systémy s přerušovanou nebo kontinuální obnovou vody nad sedimentem. Zpravidla však budou postačující a vhodnější jiné metody zvýšení kvality vody nad sedimentem, jako je například provzdušňování.

Potrava

31. Larvy je třeba krmit optimálně denně nebo nejméně třikrát týdně. Jako dostatečná dávka pro mladé larvy po dobu prvních 10 dnů se jeví krmivo pro ryby (suspenze ve vodě nebo jemně rozmělněné krmivo, např. Tetra-Min nebo Tetra-Phyll, viz podrobnosti v dodatku 2) v množství 0,25 až 0,5 mg (0,35 až 0,5 mg pro *C. yoshimatui*)) na larvu za den. Starší larvy mohou potřebovat o něco větší množství potravy: po zbývající dobu zkoušky by mělo dostačovat 0,5–1 mg na larvu denně. Pokud dojde v kontrolních skupinách k růstu plísní nebo je u nich zjištěna mortalita, je nutné přísun potravy u všech expozic snížit a kontrolovat. Pokud není možné růst plísní zastavit, je nutné zkoušku opakovat. Při testování silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5), nebo látek s kovalentní vazbou na sediment lze dávku potravy nezbytnou pro zajištění přežití a přirozeného růstu organismů přidat do přísadami doplněného sedimentu před fází stabilizace. V takovém případě je nutno místo krmiva pro ryby použít rostlinný materiál, například přídavek 0,5 % (sušiny) jemně mletých listů např. kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo jiného rostlinného materiálu (*Cerophylu* nebo alfa-celulózy).

Inkubační podmínky

32. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách se mírně provzdušňuje v optimálním případě 24 hodin po přidání larev a je sledována po celou dobu zkoušky (je třeba dbát, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 % ASV). Provzdušňování se provádí pomocí skleněné Pasteurovy pipety upevněné 2–3 cm nad vrstvou sedimentu (tj. jedna nebo několik bublin/s). Při zkoušení těkavých chemických látek je možné zvolit možnost systém sediment–voda neprovzdušňovat.

33. Zkouška se provádí při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C). Doporučená teplota pro *C. tentans* je 23 °C a pro *C. yoshimatui* 25 °C (± 2 °C). Fotoperioda je 16 hodin a intenzita světla by měla být 500 až 1 000 lux.

Trvání expozice

34. Expozice je zahájena přidáním larev do obohacených a kontrolních nádob. Maximální délka trvání expozice je 28 dnů pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dnů pro *C. tentans*. Pokud se pakomáři vylíhnou dříve, lze zkoušku ukončit po uplynutí nejméně pěti dnů od vylíhnutí posledního dospělce v kontrolní nádobě.

POZOROVÁNÍ

Líhnutí

35. Určí se čas potřebný pro vývoj a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

▼M4

36. Zkušební nádoby se kontrolují alespoň třikrát týdně s cílem vizuálně posoudit jakékoli neobvyklé chování (např. opouštění sedimentu, neobvyklé plavání), ve srovnání s kontrolními nádobami. Během období předpokládaného líhnutí je nutné denně počítat vylíhlé pakomáry. Pohlaví a počet plně vylíhlých pakomárů se denně zaznamenávají. Po identifikaci se pakomáři z nádob odstraní. Veškeré shluky vajíček nakladené před ukončením testu se zaznamenají a pak se odstraní, aby se zabránilo opětovnému zavlečení larev do sedimentu. Zaznamená se rovněž počet viditelných kukel, které se dosud nevylíhly. Pokyny pro měření líhnutí jsou uvedeny v dodatku 5.

Růst a přežívání

37. Pokud je nutné uvést údaje o desetidenním přežití a růstu larev, je třeba na počátku zkoušky přidat další zkušební nádoby tak, aby je bylo možné následně použít. Sediment z těchto dalších nádob se proseje za použití síta o velikosti 250 μm, které udrží larvy. Kritéria uhynutí jsou nepohyblivost nebo nedostatečná reakce na mechanické podněty. Larvy, které nejsou nalezeny, by měly být rovněž považovány za uhynulé (larvy uhynulé na počátku zkoušky mohly být již rozloženy mikroby). Stanoví se váha sušiny (prosté popelovin) larev, které přežily, na zkušební nádobu a vypočte se průměrná individuální hmotnost sušiny na nádobu. Je vhodné určit, do kterého instaru přežívající larvy patří; tohoto cíle lze dosáhnout pomocí změření šířky hlavové kapsuly každého jedince.

Analytická měření

Koncentrace zkoušené chemické látky

38. Musí být analyzovány minimálně vzorky vody nad sedimentem, kapilární vody a sedimentu na počátku (nejlépe hodinu po aplikaci zkoušené látky) a na konci zkoušky při nejvyšší koncentraci a jedné nižší koncentraci. Tato stanovení koncentrace zkoušené chemické látky poskytují informace o chování/distribuci zkoušené chemické látky v systému voda/sediment. Odběr vzorků sedimentu při zahájení zkoušky může ovlivnit zkušební systém (může dojít k odstranění zkušebních larev), a měly by proto být užity další zkušební nádoby k provedení analytického stanovení koncentrace na počátku zkoušky a v jejím průběhu, pokud je to vhodné (viz odstavec 39). Měření v sedimentu nemusí být nutná, pokud distribuce zkoušené látky mezi vodou a sedimentem byla jasně stanovena studií voda/sediment za srovnatelných podmínek (např. poměr sedimentu k vodě, typ aplikace, obsah organického uhlíku v sedimentu).

39. Při provádění průběžných měření (např. 7. den), a v případě, že jsou pro analýzu zapotřebí rozsáhlé vzorky, které nelze ze zkušebních nádob odebrat bez dopadu na zkušební systém, je potřeba provést analytická stanovení na vzorcích z dalších zkušebních nádob, s nimiž bylo zacházeno stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), ale nebyly použity pro biologická pozorování.

40. Doporučeným postupem izolace intersticiální vody je odstřeďování např. při odstředivé síle 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minut. Neadsorbuje-li se však zkoušená látka prokazatelně na filtry, je přijatelná i filtrace. V některých případech může být nemožné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě vzhledem k tomu, že vzorek je příliš malý.

▼M4

Fyzikálně-chemické parametry

41. pH a rozpuštěný kyslík ve zkušební vodě a teplotu ve zkušebních nádobách je nutno měřit vhodným způsobem (viz odstavec 10). Tvrdost a obsah amoniaku by měly být měřeny v kontrolních nádobách a v jedné zkušební nádobě při nejvyšší koncentraci na počátku zkoušky a na jejím konci.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené chemické látky na rychlost vývoje a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů, nebo v případě desetidenní zkoušky účinky na přežití a hmotnost larev. Pokud nejsou k dispozici žádné údaje o statistických rozdílech citlivosti mezi oběma pohlavími, lze výsledky pro samce a pro samice sloučit pro účely statistické analýzy. Rozdíly v citlivosti mezi pohlavími lze statisticky posoudit např. pomocí χ^2 – r × 2 tabulkového testu. Je-li vyžadováno stanovení přežití larev a průměru individuální sušiny na jednu nádobu, je nutné tak učinit po 10 dnech.

43. Koncentrace s pozorovanými účinky vyjádřené jako koncentrace ve vodě nad sedimentem se vypočtou přednostně na základě naměřených koncentrací na počátku zkoušky (viz bod 38).

44. Pro výpočet bodového odhadu EC_{50} nebo jakékoli jiné hodnoty EC_x lze jako skutečné opakování použít statistiku na jednu nádobu. Při výpočtu intervalu spolehlivosti pro každý EC_x je nutno zohlednit variabilitu mezi jednotlivými nádobami, případně prokázat, že tato variabilita je tak nízká, že ji lze ignorovat. Je-li u modelu užita metoda nejmenších čtverců, je nutné u statistik jednotlivých nádob uplatnit transformaci za účelem homogenity rozptylu. Hodnoty EC_x je však třeba vypočítat až poté, co je reakce převedena zpět na původní hodnotu.

45. Pokud je cílem statistické analýzy stanovení hodnoty NOEC/LOEC testováním hypotéz, je nutné vzít v úvahu variabilitu mezi nádobami, například pomocí analýzy rozptylu ANOVA. Případně mohou být vhodnější robustnější testy (21) v případě, že dojde k porušení předpokladů obvykle užitých při analýze ANOVA.

Procento vylíhlých jedinců

46. Procento vylíhlých jedinců jsou kvantové údaje a lze je analyzovat s použitím postupně klesajícího Cochranova-Armitageova testu, který předpokládá monotónní odezvu na dávku, a tato data jsou konzistentní s tímto očekáváním. V opačném případě lze použít Fisherův exaktní test nebo Mantelův-Haenszelův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí hodnot p. Pokud existují důkazy o větší variabilitě mezi replikacemi ve stejné koncentraci, pak by binomické rozdělení (často uváděné jako „extra-binomická“ variabilita) nasvědčovala tomu, že je nutno použít robustní Cochranův-Armitageův test nebo Fisherův exaktní test, jak je navrhováno v odstavci (21).

47. Určí se součet pakomárů vylíhlých v jedné nádobě ne a vydělí se počtem vložených larev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

kde:

ER = procento vylíhlých jedinců,

n_e = počet pakomárů vylíhlých v nádobě,

n_a = počet larev nasazených do nádoby.

48. Nejvhodnější alternativou pro rozsáhlé vzorky s extra binomickou variací je pojmout procento vylíhlých jedinců jako kontinuální odezvu a použít postupy, jako je například Williamsův test, pokud existuje předpoklad monotónní odezvy na dávku a je konzistentní s těmito daty ER. V případě nemonotónní odezvy by byl vhodný Dunnettův test. Rozsáhlý vzorek je zde definován situací, při níž jak počet vylíhlých jedinců, tak počet nevylíhlých jedinců přesáhnou v jednom duplikátním vzorku (nádobě) hodnotu pět.

49. Při použití metody ANOVA je nutno hodnoty ER nejprve transformovat (například druhou odmocninou arcsinu) nebo transformací podle Freemana-Tukeyho s cílem získat přibližné normální rozdělení údajů a vyrovnat odchylky. Při použití absolutních frekvencí lze použít test dle Cochrana-Armitage, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test. Transformace funkcí rovnou √arcsin se vypočte pomocí převrácené hodnoty sinu ($\sin^{-1}$) z odmocniny ER.

50. Pro procento vylíhlých jedinců se hodnoty EC_x vypočtou pomocí regresní analýzy (nebo např. pomocí modelu probit, (22), logit, Weibull, vhodného komerčního softwaru atd.). V případě selhání regresní analýzy (např. v případě méně než dvou koncentrací s parciálními odezvami) se použijí další neparametrické metody, jako je například klouzavý průměr nebo prostá interpolace.

Rychlost vývoje

51. Průměrná doba vývoje představuje průměrné časové rozpětí mezi nasazením larev (den 0 zkoušky) a vylíhnutím experimentální kohorty pakomárů. (Pro výpočet skutečné doby vývoje by mělo být zohledněno stáří larev v okamžiku nasazení. Rychlost vývoje je převrácenou hodnotou doby vývoje (jednotka: 1/den) a představuje část larválního vývoje, která se odehraje za den. Rychlost vývoje je z hlediska hodnocení těchto studií toxicity sedimentů preferována před dobou vývoje vzhledem k její nižší variabilitě, vyšší homogenitě a větší blízkosti normálnímu rozdělení. Z tohoto důvodu mohou být použity silné parametrické zkušební postupy pro rychlost vývoje, a ne pro dobu vývoje. Pro rychlost vývoje jako kontinuální odezvu lze hodnoty EC_x stanovit odhadem pomocí regresní analýzy (např. (23), (24).)

52. U následujících statistických testů se má za to, že počet pakomárů pozorovaných v inspekčním dni x se vylíhl v průměru časového intervalu mezi dnem x a dnem x – l (l = délka intervalu mezi pozorováními, obvykle 1 den). Průměrná rychlost vývoje na nádobu (x) se vypočte podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kde:

$\bar{x}$: střední rychlost vývoje v kádince,

i: index intervalu mezi pozorováními,

m: maximální počet všech intervalů mezi pozorováními,

▼M4

f_i: počet vylíhlých jedinců během daného intervalu mezi pozorováními i,

n_e: celkový počet vylíhlých jedinců celkem na konci pokusu ($\sum f_i$)

x_i: rychlost vývoje pakomárů vylíhlých v intervalu i,

$$x_i = 1/\left(den_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kde:

den_i:den pozorování (ve dnech od aplikace),

l_i: délka intervalu i mezi pozorováními (ve dnech, obvykle 1 den).

Protokol o zkoušce

53. Protokol o zkoušce musí obsahovat minimálně tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povahu a případně fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpustnost ve vodě, tlak par, rozdělovací koeficient v půdě (případně v sedimentu), stabilita ve vodě, atd.),

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky.

Testovací druh:

— užitá pokusná zvířata: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky množení,

— informace o nakládání se shluky vajíček a s larvami,

— stáří testovaných zvířat po nasazení do zkušebních nádob.

Zkušební podmínky:

— použitý sediment, tj. přírodní nebo přísadami doplněný sediment,

— u přírodního sedimentu lokalita a popis místa odběru sedimentu, pokud možno včetně dřívější kontaminace, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíku, poměr C/N a zrnitost (je-li to vhodné),

— příprava přísadami doplněného sedimentu: složky a charakteristiky (obsah organického uhlíku, pH, vlhkost, atd. na začátku zkoušky),

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, vodivost, tvrdost, atd. na začátku zkoušky),

— hloubka sedimentu a vody nad sedimentem,

— objem vody nad sedimentem a kapilární vody, hmotnost vlhkého sedimentu s kapilární vodou a bez ní,

— zkušební nádoby (materiál a rozměry),

— metoda přípravy zásobních roztoků a zkušební koncentrace,

▼M4

— aplikace zkoušené látky, použité zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a případné použití rozpouštědla,

— inkubační podmínky: teplota, cyklus a intenzita světla, provzdušňování (frekvence a intenzita),

— podrobné informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení.

Výsledky:

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušební nádobě,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách, tj. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, tvrdost a amoniak,

— případné nahrazování odpařené zkušební vody,

— počet vylíhlých samců a samic pakomárů na nádobu a na den,

— počet larev, z nichž se nevylíhli dospělci, na nádobu,

— průměrná individuální hmotnost sušiny larev na nádobu a případně na instar,

— procento vylíhlých jedinců na duplikátní vzorek a zkušební koncentraci (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— průměrná rychlost vývoje plně vylíhlých pakomárů na duplikátní vzorek a aplikované množství (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— odhady koncových bodů toxicity, např. ECx (a související intervaly spolehlivosti), NOEC a/nebo LOEC a statistické metody použité k jejich stanovení,

— diskuse o výsledcích včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA:

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Kapitola C.8 této přílohy, Toxicita pro žížaly,

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Pro účely této metody se použijí tyto definice:

Přísadami doplněný sediment nebo rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment je směs materiálů užitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Intersticiální voda nebo kapilární voda je voda zabírající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Obohacená voda je zkušební voda, do níž byla přidána zkoušená látka.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 2

Doporučení pro kultivaci kultury *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* lze chovat v krystalizačních miskách nebo ve větších nádobách. Jemný křemičitý písek se rozprostře po dně nádoby v tenké vrstvě silné 5 až 10 mm. Bylo prokázáno, že substrátem vhodným jako podklad je také křemelina (např. Merck, čl. 8117), (dostačující je tenčí vrstva silná jen několik málo mm). Následně se přidá několikacentimetrová vrstva vhodné vody. Objem vody by se měl podle potřeby doplňovat s cílem nahradit ztráty vzniklé odpařováním a zabránit vysychání. Vodu lze v případě potřeby vyměnit. Je třeba zajistit mírné provzdušňování. Nádoby, v nichž jsou larvy chovány, by měly být umístěny ve vhodné kleci, která zabrání úniku líhnoucích se dospělců. Tato klec by měla být dostatečně velká, aby umožňovala rojení vylíhlých dospělců, jinak by nemuselo dojít k jejich páření (minimum je přibližně 30×30×30 cm).

2. Klece by měly být umístěny při pokojové teplotě nebo v místnosti s konstantní teplotou 20 ± 2 °C s fotoperiodou 16 hodin světlo (intenzity přibližně 1 000 lux) a 8 hodin tma. Bylo zjištěno, že vzdušná vlhkost nižší než 60 % RH může bránit rozmnožování.

Ředicí voda

3. Lze použít jakoukoli vhodnou přírodní nebo syntetickou vodu. Zpravidla se užívá studniční voda, odchlorovaná vodovodní voda a umělá média (např. Elendtovo médium „M4“ nebo „M7“, viz níže). Vodu je před použitím nutno provzdušnit. Je-li to nutné, lze kultivační vodu obnovit opatrným odlitím nebo odčerpáním použité vody z kultivačních nádob tak, aby nedošlo k poškození schránek larev.

Krmení larev

4. Larvy rodu *Chironomus* by se měly krmit vločkovým krmivem pro ryby (TetraMin(®, Tetra Phyll® nebo jiná podobná značka patentovaného krmiva pro ryby), v množství přibližně 250 mg na nádobu a den. Potravu lze aplikovat v podobě suchého mletého prášku nebo v podobě suspenze ve vodě: 1,0 g vločkového krmiva se přidá do 20 ml ředicí vody a vytvoří se homogenní směs. Tento přípravek lze dodávat rychlostí přibližně 5 ml na nádobu na den (před použitím protřepat). Starším larvám lze přidat více krmiva.

5. Krmení se upraví podle kvality vody. V případě, že se kultivační médium „zakalí“, je třeba krmnou dávku snížit. Přidávání potravy je nutno pečlivě sledovat. Příliš malé množství krmiva způsobí, že larvy opouštějí sediment a vznášejí se ve vodním sloupci, a příliš mnoho krmiva způsobí zvýšenou mikrobiální činnost a pokles koncentrace kyslíku. Obojí může způsobit snížení rychlosti růstu.

6. Do nových kultivačních nádob mohou být přidány i buňky zelených řas (např. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Krmení vylíhlých dospělců

7. Někteří experimentátoři se domnívají, že jako potrava vylíhlých dospělců může sloužit vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy.

▼M4

Líhnutí

8. Dospělci se začnou v chovných nádobách líhnout při teplotě 20 ± 2 °C přibližně po 13–15 dnech. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

Shluky vajíček

9. Jakmile se ve snubní komůrce nacházejí dospělci, je třeba třikrát týdně kontrolovat všechny reprodukční nádoby, zda se v nich nacházejí shluky vajíček spojené želatinózní hmotou. Pokud se zde shluky vajíček nacházejí, je nutno je opatrně odstranit a přemístit do malé misky obsahující vzorek chovného vodního prostředí. Shluky vajíček se užijí pro založení nové nádoby s kulturou (např. 2–4 shluky vajíček na nádobu) nebo se užijí pro zkoušky toxicity.

10. Larvy prvního instarového stadia by se měly vylíhnout za 2–3 dny.

Zakládání nových kultivačních nádob

11. Jakmile jsou kultury založeny, mělo by být možné zakládat nové nádoby s kulturami larev jednou týdně nebo méně často v závislosti na zkušebních požadavcích a odstraňovat starší nádoby po vylíhnutí dospělců. Pomocí tohoto systému se zajistí pravidelné dodávky dospělců s minimální potřebou dohledu.

Příprava zkušebních roztoků „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) popsal médium „M4“. Médium „M7“ se připraví obdobně jako médium „M4“ s výjimkou látek uvedených v tabulce 1, u nichž jsou koncentrace u „M7“ čtyřikrát nižší než u „M4“. Připravuje se publikace o médiu „M7“ (Elendt, osobní sdělení). Podle Elendta a Biase (1990) by se zkušební roztok neměl připravovat pro koncentrace $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 vzhledem k tomu, že nejsou pro přípravu zásobních roztoků vyhovující.

Příprava média „M7“

13. Každý zásobní roztok (I) se připraví samostatně a z těchto zásobních roztoků (I) se pak připraví kombinovaný zásobní roztok (II) (viz tabulka 1). Médium „M7“ se připraví přidáním 50 ml kombinovaného zásobního roztoku (II) a množství zásobního roztoku jednotlivých makroživin, které jsou uvedeny v tabulce 2, do 1 litru deionizované vody. Připraví se vitaminový zásobní roztok přidáním tří vitaminů do deionizované vody, jak je uvedeno v tabulce 3, a 0,1 ml kombinovaného vitaminového zásobního roztoku se přidá do výsledného média „M7“ krátce před použitím. (Vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých alikvotních dílech.) Médium se provzdušní a stabilizuje.

Tabulka 1

Zásobní roztoky stopových prvků pro médium M4 a M7

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tyto chemické látky se u M4 a M7 liší, jak je uvedeno výše.
(2) Tyto roztoky se připravují samostatně, spojí se a ihned se zpracují v autoklávu.

Tabulka 2

Zásobní roztoky makroživin pro médium M4 a M7

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství zásobních roztoků makroživin přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabulka 3

Vitaminový zásobní roztok pro médium M4 a M7

Všechny tři vitaminové roztoky se smísí do jediného vitaminového zásobního roztoku.

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství vitaminového zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Dodatek 3

PŘÍPRAVA PŘÍSADAMI DOPLNĚNÉHO SEDIMENTU

Složení sedimentu

Složení přísadami doplněného sedimentu by mělo být následující:

Složka	Charakteristika	% sušiny sedimentu
Rašelina:	rašelina mechu Sphagnum s pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená na vzduchu	4–5
Křemičitý písek	velikost zrn: > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm	75–76
Kaolinitický jíl	obsah kaolinitu≥ 30 %	20
Organický uhlík	upraven přidáním rašeliny a písku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý	0,05–0,1
Voda	vodivost ≤ 10 μS/cm	30–50

Příprava

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele se na jemný prášek. Připraví se suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě s použitím vysoce výkonného homogenizačního zařízení. pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se kondicionuje po dobu nejméně dvou dní za mírného promíchávání při 20 ± 2 °C za účelem stabilizace pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by se mělo rovnat 6,0 ± 0,5. Pak se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a kaolín) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 procent sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti je opět upraveno pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Následně se doporučuje před použitím pro zkoušku toxicity pro pakomáry přísadami doplněný sediment kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následné zkoušce.

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Přísadami doplněný (mokrý) sediment by neměl být před použitím ve zkoušce skladován. Měl by být použit ihned po uplynutí sedmidenního období kondicionování, kterým končí jeho příprava.

LITERATURA:

Kapitola C.8 této přílohy. Toxicita pro žížaly.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Chemické charakteristiky přípustné ředicí vody

Látka	Koncentrace
Částice tuhé	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdost jako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organické fosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

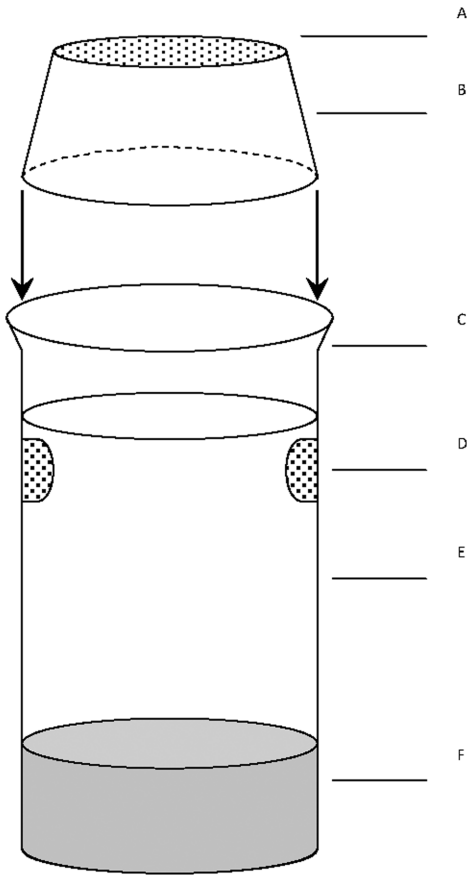
(*) Je však třeba poznamenat, že v případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vod a zkoušenou látkou, by měla být použita voda nižší tvrdosti (a proto se v této situaci nesmí použít Elendtovo médium M4).

▼**M4**

Dodatek 5

Pokyny pro monitorování líhnutí larev pakomárů

Na zkušební kádinky jsou umístěny výletové pasti. Tyto pasti jsou potřebné od 20. dne až do konce zkoušky. Níže je nakreslen příklad používané pasti:



A: nylonová síťka

B: plastový kryt

C: kádinka bez zobáčku

D: otvory na výměnu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.29 HODNOCENÍ SNADNÉ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – UVOLŇOVÁNÍ CO_2 V TĚSNĚ UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (*HEADSPACE TEST*)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 310 (2006). Tato zkušební metoda je screeningovou metodou pro hodnocení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek a poskytuje obdobné informace jako šest zkušebních metod popsaných v kapitole C.4 této přílohy A až F. Proto lze chemickou látku, která v této zkušební metodě vykazuje pozitivní výsledky, považovat za snadno biologicky rozložitelnou a v důsledku toho rychle rozložitelnou v prostředí.

2. Dobře vyzkoušená metoda uvolňování oxidu uhličitého (CO_2) (1), která je založena na původní Sturmově zkoušce (2) hodnocení biologické rozložitelnosti organických chemických látek měřením emisí oxidu uhličitého produkovaného mikrobiální činností, je zpravidla první možností testování špatně rozpustných a silně absorbujících chemických látek. Je užívána rovněž v případě rozpustných (avšak nikoli těkavých) látek, protože uvolňování oxidu uhličitého řada odborníků považuje za jediný nepochybný důkaz mikrobiální aktivity. Odstranění rozpuštěného organického uhlíku se může uskutečnit fyzikálně-chemickými procesy – adsorpcí, vypařováním, srážením, hydrolýzou, ale je spotřebováván i mikrobiální činností a při řadě nebiologických reakcí; jen vzácně vzniká CO_2 z organických sloučenin abioticky. V původní a modifikované Sturmově zkoušce (1, 2) se odstraní CO_2 z kapalné fáze do absorpčních nádob probubláváním (tj. bublající vzduch upravený na odstraňování CO_2 prostřednictvím kapalného prostředí), zatímco v Larsonově verzi (3, 4) se CO_2 přenáší z reakční nádoby do absorbérů prohánění vzduchu bez CO_2 přes plynnou fázi, a navíc neustálým třepáním zkušební nádobou. Pouze v Larsonově modifikaci se reakční nádobou třepe; míchání je určeno pouze pro nerozpustné látky podle normy ISO 9439 (5) a v originální americké verzi (6), které obě uvádějí probublávání, a nikoli nahrazování plynné fáze. V jiné oficiální metodě US EPA (7) založené na Gledhillově metodě (8) se třesená reakční nádoba uzavře před atmosférou a vytvořený CO_2 se shromažďuje ve vnitřním zásaditém zařízení pro zachycování přímo z plynné fáze, stejně jako v klasických Warburg/Barcroftových respirometrických baňkách.

3. U anorganického uhlíku (IC) však bylo prokázáno, že se při použití standardní modifikované Sturmovy zkoušky u řady chemických látek hromadí v médiu (9). Při rozkladu 20 mg C/l anilinu byla zjištěna koncentrace IC až 8 mg/l. To znamená, že zachycování CO_2 v zásaditém zařízení pro zachycování neposkytovalo věrný obraz o množství CO_2 vyprodukovaného mikrobiologicky v mezičasech během rozkladu. V důsledku této skutečnosti nebude specifikace, že > 60 % teoretické maximální produkce CO_2 (TCO_2) se musí shromáždit v průběhu „10denního období rozkladu“ (10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % rozkladu), aby bylo možno zkoušenou chemickou látku klasifikovat jako snadno biologicky rozložitelnou, dodržena u některých chemických látek, které by byly takto klasifikovány pomocí odstranění rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

4. Když má procento rozkladu nižší než předpokládanou hodnotu, je možné, že dochází k hromadění IC ve zkušebním roztoku. V takovém případě lze rozložitelnost odhadnout pomocí ostatních zkoušek snadné biologické rozložitelnosti.

▼M4

5. Další nedostatky Sturmovy metodiky (těžkopádná, časově náročná, náchylnější k experimentálním chybám a nepoužitelná pro těkavé chemické látky) již dříve podnítily snahu hledat jinou než Gledhillovu techniku využívající těsně uzavřené nádoby, která by nebyla založena na průtoku plynu. (10, 11). Boatman a spolupracovníci (12) přezkoumali již existující metody a přijali metodu systému těsně uzavřených lahviček, v nichž se CO_2 uvolňuje do plynné fáze na konci inkubace po okyselení média. Obsah CO_2 byl měřen pomocí plynové chromatografie (analýza GC)/IC) ve vzorcích automaticky odebíraných z plynné fáze, avšak nebyl zohledněn rozpuštěný anorganický uhlík (DIC) v kapalné fázi. Rovněž použité nádobky byly velmi malé (20 ml) a obsahovaly pouze 10 ml média, což bylo příčinou problémů, např. při přidávání množství nerozpustných zkoušených chemických látek, které nutně muselo být jen velmi malé, případně vzhledem k přítomnosti nedostatečného nebo nulového množství mikroorganismů schopných rozložit zkoušené chemické látky v inokulovaném médiu.

6. Tyto obtíže překonaly nezávislé studie Struijse a Stoltenkampa (13) a Birche a Fletchera (14), přičemž poslední z uvedených byli inspirováni svými zkušenostmi se zařízením používaným při zkoušce anaerobního biologického rozkladu (15). Při užití původní metody (13) se měří CO_2 v plynné fázi po okyselení a ustavení rovnováhy, zatímco ve druhém případě (14) se měřil DIC v plynné i v kapalné fázi bez expozice; přes 90 % vytvořeného IC se nacházelo v kapalné fázi. Obě metody mají oproti Sturmově zkoušce výhodu v tom, že zkušební systém byl kompaktnější a lépe ovladatelný, lze v něm zkoušet těkavé chemické látky a lze se vyhnout zpoždění při měření vyprodukovaného CO_2.

7. Oba tyto přístupy byly spojeny v normě ISO upravující CO_2 „headspace“ metodu (16), která byla zkoušena v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (17), a tato norma tvoří základ této zkušební metody. Oba uvedené přístupy byly použity rovněž v metodě US EPA (18). Jsou doporučovány dvě metody měření CO_2, a to měření CO_2 v plynné fázi po okyselení (13) a IC v kapalné fázi po přídavku nadbytku zásady. Druhou metodu zavedl Peterson při mezilaboratorní porovnávací zkoušce CONCAWE (19) této headspace metody upravené tak, aby měřila vlastní biologickou rozložitelnost. Do této zkušební metody byly začleněny změny provedené při přepracování těchto metod z roku 1992 (20) v kapitole C.4 této přílohy o snadné biologické rozložitelnosti, takže podmínky (médium, trvání apod.) jsou jinak stejné jako podmínky v přepracované Sturmově zkoušce (20). Birch a Fletcher (14) ukázali, že pomocí této headspace zkoušky byly získány velmi podobné výsledky jako u stejných chemických látek v mezilaboratorní porovnávací zkoušce přepracovaných zkušebních metod OECD (21).

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Zkoušená látka se zpravidla v koncentraci 20 mg C/l jako jediný zdroj uhlíku a energie inkubuje v pufru – médiu vytvořeném z minerálních solí, které je inokulováno směsnou kulturou mikroorganismů. Zkouška se provádí v těsně uzavřených nádobách s určitým volným objemem vzduchu pod víčkem, který představuje rezervoár kyslíku pro aerobní biologický rozklad. Uvolňování CO_2 v důsledku úplného aerobního biologického rozkladu zkoušené chemické látky se stanoví měřením produkce IC ve zkušebních nádobách, která je větší než produkce slepým stanovením u nádob obsahujících pouze inokulované médium. Stupeň biologického rozkladu se vyjadřuje v procentech teoretické maximální produkce anorganického uhlíku (ThIC), vztažené k množství zkoušené chemické látky (jako je například organický uhlík) přidané na začátku zkoušky.

9. U zkoušených látek lze stanovit také úbytek DOC a/nebo rozsah primárního biologického rozkladu nebo zkoušené chemické látky (20).

▼M4

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

10. Pro výpočet procenta rozkladu musí být znám obsah organického uhlíku (% w/w) ve zkoušené chemické látce, a to buď na základě její chemické struktury, nebo na základě měření. U těkavých zkoušených látek je pro stanovení vhodného poměru mezi plynnou a kapalnou fází vhodné použít změřenou nebo vypočítanou Henryho konstantu. Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou užitečné při výběru vhodné zkušební koncentrace a při interpretaci výsledků, které ukazují na špatnou biologickou rozložitelnost; doporučuje se zahrnout kontrolu inhibice s výjimkou případů, kdy je známo, že zkoušená látka nepůsobí inhibičně na mikrobiální aktivity (viz odstavec 24).

VHODNOST ZKUŠEBNÍ METODY

11. Zkoušku lze použít pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpustné ve vodě, i pro nerozpustné zkoušené chemické látky, avšak je nezbytné, aby se zkoušená chemická látka dobře rozptýlila. Při použití doporučeného poměru 1:2 mezi plynnou a kapalnou fází lze zkoušet těkavé chemické látky s Henryho konstantou do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ vzhledem k tomu, že podíl zkoušené chemické látky v plynné fázi nepřesáhne 1 % (13). Při zkoušení chemických látek, které jsou méně stálé, lze použít menší objem plynné fáze, avšak jejich biologická dostupnost může být omezující, zejména v případě, že jsou špatně rozpustné ve vodě. Uživatelé však musí zajistit, aby poměr mezi plynnou a kapalnou fází a koncentrace zkoušené chemické látky byly takové, aby zajišťovaly dostatečnou koncentraci kyslíku v plynné fázi pro úplný aerobní biologický rozklad (např. je nutné se vyvarovat použití vysokých koncentrací substrátu a malého objemu plynné fáze). Pokyny týkající se této problematiky lze nalézt v bodech (13, 23).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

12. Za účelem kontroly zkušebního postupu by měla být současně zkoušena referenční látka známé biologické rozložitelnosti. Za tímto účelem lze použít anilin, benzoát sodný nebo ethylenglykol pro zkoušení chemických látek rozpustných ve vodě a oktan-1-ol pro špatně rozpustné zkoušené chemické látky (13). Biologický rozklad těchto látek musí do 14 dnů dosáhnout > 60 % ThIC.

REPRODUKOVATELNOST

13. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce této metody dle ISO (17), byly při dodržení doporučených podmínek včetně koncentrace zkoušené chemické látky 20 mg C/l dosaženy tyto výsledky:

Zkoušená chemická látka	Průměrné procento biologického rozkladu (28 d)	Variační koeficient (%)	Počet laboratoří
Anilin	90	16	17
Oktan-1-ol	85	12	14

Mezilaboratorní variabilita (reprodukovatelnost) byla u anilinu nízká, přičemž variační koeficient téměř u všech zkoušek nepřesáhl 5 %. V obou případech, kdy byla reprodukovatelnost nižší, byla vyšší variabilita pravděpodobně důsledkem vysoké produkce IC u slepého stanovení. Reprodukovatelnost u oktan-1-olu byla nižší, přesto však byla u 79 % zkoušek nižší než 10 %. Tato větší variabilita v rámci zkoušek může být způsobena chybami v dávkování vzhledem k tomu, že do pevně uzavřených zkušebních lahviček je nutno vstříknout malý objem (3–4 μl) oktan-1-olu. Vyšších variačních koeficientů by bylo dosaženo při použití nižších koncentrací zkoušené chemické látky, a to zejména v koncentracích nižších než 10 mg C/l. Tomu by bylo možné částečně předejít snížením koncentrace celkového anorganického uhlíku (TIC) v inokulu.

▼M4

14. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce EU (24) byly z pěti povrchově aktivních látek přidaných na 10 mg C/l získány tyto výsledky:

Zkoušená chemická látka	Průměrné procento biologického rozkladu (28 d)	Variační koeficient (%)	Počet laboratoří
Tetrapropylen Benzensulfonát	17	45	10
Di-iso-oktylsulfosukcinát (aniontový)	72	22	9
Hexadecyl-trimethyl (*) Chlorid amonný (kationtový)	75	13	10
Iso-nonylfenol -*(ethoxylát)*$_9$ (neiontový)	41	32	10
Kokamidopropyl Dimethylhydroxy sulfobetain (amfoterní)	60	23	11

(*) Pro neutralizaci toxicity byl přidán SiO_2.

Výsledky ukazují, že obecně platí, že variabilita byla vyšší u hůře rozložených povrchově aktivních látek. Variabilita v rámci zkoušky byla u více než 90 % případů nižší než 15 %, přičemž nejvyšší dosáhla 30–40 %.

POZNÁMKA: Většina povrchově aktivních látek nejsou jednotlivé molekuly, ale jedná se o směsi izomerů, homology atd., které se rozkládají po různých charakteristických lagových fázích a podle různých kinetických rychlostních konstant vedoucích k „rozostření“ zeslabených křivek, takže 60 % hodnoty „vyhověla“ nelze dosáhnout v rámci „10denního období rozkladu“, i kdyby každá jednotlivá molekula dosáhla hodnoty > 60 % během 10 dnů, pokud by byla testována samostatně. Obdobně je tomu při použití jiných komplexních směsí.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

15. Obvyklé laboratorní vybavení a dále:

a) skleněné lahvičky na sérum, těsně uzavřené pryžovým septem z butylkaučuku s hliníkovými lemovacími uzávěry. Doporučená velikost je „125 ml“, která má celkový objem asi 160 ml (v tomto případě by mělo být známo, že objem každé láhve je 160 ± 1 ml). Menší nádobu lze použít tehdy, pokud výsledky splňují podmínky uvedené v odstavcích 66 a 67;

b) analyzátor uhlíku nebo jiný přístroj (například plynový chromatograf) ke stanovení anorganického uhlíku;

▼M4

c) stříkačky s vysokou přesností pro plynné a vodné vzorky;

d) orbitální třepačka v termostatovaném prostředí;

e) zásoba vzduchu bez CO_2 – lze ji připravit prohánění vzduchu přes granule natronového vápna nebo použitím plynné směsi 80 % N_2 a 20 % O_2 (nepovinné) (viz odstavec 28);

f) zařízení pro filtraci s membránovými filtry porozity 0,20 až 0,45 μm (nepovinné);

g) analyzátor organického uhlíku (nepovinné).

Činidla

16. Používají se pouze chemikálie zaručené analytické jakosti.

Voda

17. Měla by se používat destilovaná nebo deionizovaná voda s celkovým obsahem organického uhlíku ≤ 1 mg/l. To představuje ≤ 5 % z počáteční hodnoty organického uhlíku vneseného doporučenou dávkou zkoušené chemické látky.

Zásobní roztoky pro médium s minerálními solemi

18. Zásobní roztoky a médium s minerálními solemi jsou obdobné jako u zkoušek „snadné biologické rozložitelnosti“ podle ISO 14593 (16) a C.4 (20). Použití vyšší koncentrace chloridu amonného (2,0 g/l místo 0,5 g/l) by mělo být nutné jen ve velmi výjimečných případech, např. tehdy, pokud je koncentrace zkoušené chemické látky > 40 mg C/l. Zásobní roztoky by měly být skladovány v chladničce a zlikvidovány po šesti měsících, nebo dříve, pokud dochází k tvorbě sraženin nebo růstu mikroorganismů. Připraví se tyto zásobní roztoky:

a) Bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) 8,50 g

Bezvodý hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4) 21,75 g

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Chlorid amonný(NH_4Cl) 0,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH tohoto roztoku musí být 7,4 (± 0,2). Pokud tomu tak není, připraví se nový roztok.

b) Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

c) Heptahydrát síranu hořečnatého ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

d) Hexahydrát chloridu železitého ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr a přidá se kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Příprava minerálního média

19. Smísí se 10 ml roztoku a) s přibližně 800 ml vody (odstavec 17), přidá se po 1 ml roztoků b), c) a d) a doplní se vodou na 1 litr (odstavec 17).

Další činidla

20. Koncentrovaná kyselina orthofosforečná (H_3PO_4) (> 85 % hmotnosti na objem).

▼M4

Roztok hydroxidu sodného 7M

21. V litru vody se rozpustí 280 g hydroxidu sodného (NaOH) (odstavec 17). Stanoví se koncentrace DIC tohoto roztoku a tato hodnota se bere v úvahu při výpočtu výsledku zkoušky (viz odstavce 55 a 61), zejména ve světle kritéria validity v odstavci 66 b). Pokud je koncentrace DIC příliš vysoká, použije se čerstvě připravený roztok.

Zkoušená látka

22. Připraví se zásobní roztok zkoušené chemické látky dostatečně rozpustné ve vodě (odstavec 17) nebo ve zkušebním médiu (odstavec 19) v koncentraci optimálně stonásobně vyšší, než bude výsledná koncentrace při zkoušce; může být nutné upravit pH zásobního roztoku. Zásobní roztok se přidá do minerálního média tak, aby konečná koncentrace organického uhlíku byla 2 až 40 mg C/l, optimálně 20 mg C/l. Při použití nižších koncentrací může dojít k omezení výsledné přesnosti. Rozpustné i nerozpustné kapalné chemické látky mohou být do nádob dávkovány přímo stříkačkami s vysokou přesností. Málo rozpustné a nerozpustné zkoušené chemické látky mohou vyžadovat speciální zacházení (25). Lze použít následující postupy:

a) přímý přídavek známých odvážených množství;

b) dispergace ultrazvukem před přidáním;

c) dispergace za přídavku emulgačních činidel, která bude nezbytná pro zjištění, zda mají inhibiční nebo stimulační účinky na mikrobiální aktivitu před přidáním;

d) adsorpce kapalných zkoušených chemických látek nebo roztoku ve vhodném těkavém rozpouštědle, na inertním nosiči nebo prostředí (např. filtr ze skleněných vláken) s následným odpařením rozpouštědla, pokud bylo použito, a přímé přidání známého množství;

e) přidání známého množství roztoku zkoušené chemické látky v lehce těkavém rozpouštědle do prázdné zkušební nádoby a následné odpaření rozpouštědla.

Prostředky nebo rozpouštědla užitá v písmenech c), d) a e) musí být testovány na případné stimulační nebo inhibiční účinky na mikrobiální aktivitu (viz odstavec 42 (b)).

Referenční chemická látka

23. Připraví se zásobní roztok (rozpustné) referenční chemické látky ve vodě (odstavec 17) v koncentraci optimálně stonásobně vyšší než bude výsledná koncentrace (20 mg C/l) při zkoušce.

Kontrola inhibice

24. U zkoušených chemických látek často nedochází k významnému rozkladu za podmínek užitých při stanovení snadného biologického rozkladu. Jednou z možných příčin je to, že zkoušená látka působí inhibičně na inokulum v koncentraci užité při zkoušce. Do zkoušky může být zahrnuta kontrola inhibice s cílem usnadnit (zpětnou) identifikaci inhibice jako možné příčiny nebo přispívajícího faktoru. Kontrola inhibice může rovněž vyloučit takové interference a prokázat, že nulový nebo jen mírný rozklad je důsledkem výhradně nedostatečné náklonnosti k mikrobiologickému napadení za podmínek zkoušky. Pro získání informací o toxicitě zkoušené chemické látky pro (aerobní) mikroorganismy se připraví roztok ve zkušebním médiu obsahujícím zkoušenou látku a referenční chemickou látku (bod 19) obsahující stejnou koncentraci jak zkoušené chemické látky, tak referenční chemické látky (viz odstavec 22 a 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi (20). Aktivita zdroje z hlediska biologického rozkladu se ověří referenční látkou. Bez ohledu na zdroj by v případě, že se postup má užít jako zkouška na snadnou biologickou rozložitelnost, neměly použít mikroorganismy, které byly již dříve vystaveny působení zkoušené chemické látky.

Upozornění: Aktivovaný kal, odpadní voda a splašková voda obsahují patogenní organismy a je nutno s nimi zacházet s opatrností.

26. Na základě zkušeností se optimálním objemem inokula rozumí:

— objem, který vykazuje dostatečnou aktivitu k biologickému rozkladu,

— objem, který rozkládá referenční látku v dohodnuté procentuální míře (viz odstavec 66)

— objem obsahující 10^2 až 10^5 kolonie tvořících jednotek v 1 ml konečné směsi,

— objem, který obvykle poskytuje koncentraci sušiny aktivovaného kalu ve výsledné směsi 4 mg/l (koncentrace až do 30 mg/l jsou možné, mohou však významně ovlivnit produkci CO_2 slepého stanovení (26),

— objem, který poskytuje koncentraci rozpuštěného organického uhlíku v inokulu menší než 10 % počáteční koncentrace organického uhlíku v přidané zkoušené látce,

— obecně objem 1–10 ml inokula na litr zkoušeného roztoku.

Aktivovaný kal

27. Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Pokud je to nutné, odstraní se hrubé částice filtrací sítem (např. s velikostí ok 1 mm^2) a kal se udržuje za aerobních podmínek.

28. Kal se může po odstranění hrubých částic také usadit nebo odstředit (např. 1 100 × g po dobu 10 minut). Kapalná fáze nad usazeninou se odstraní. Kal lze promýt minerálním roztokem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných tuhých látek na litr. Následně se kal před použitím provzdušňuje.

29. Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem, nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, kapalina nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

30. Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných tuhých látek.

31. Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 minuty rozmělňuje v mixeru Waring při střední rychlosti. Rozmělněný kal se nechá 30 minut (popřípadě déle) usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml/l minerálního média.

▼M4

32. Aby se ještě dále snížila hodnota slepého stanovení CO_2, může být kal před použitím aklimatizován provzdušňováním přes noc vzduchem bez obsahu CO_2. Jako inokulum se při této zkoušce použije koncentrace sušiny aktivovaného kalu 4 mg/l.

Inokulum z druhého stupně čistírny odpadních vod

33. Inokulum lze získat rovněž z výstupu druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Tento vzorek se udržuje v aerobních podmínkách a používá se v den odběru nebo podle potřeby po aklimatizaci. Z odtoku se odstraní větší částice filtrací přes hrubý filtr a změří se hodnota pH.

34. Filtrát se za účelem snížení obsahu IC provzdušňuje vzduchem bez CO_2 (odstavec 15-e) po dobu 1 h, přičemž se hodnota pH udržuje na 6,5 kyselinou fosforečnou (odstavec 20). Potom se hodnota pH upraví na původní hodnotu hydroxidem sodným (odstavec 21) a nakonec se vzorek ponechá v klidu po dobu 1 h a vhodný objem kapalné fáze se použije pro inokulaci. Tento postup snižuje obsah IC inokula. Jestliže se například použije jako inokulum maximálně 100 ml filtrovaného provzdušněného odtoku na 1 litr, mělo by se při slepém stanovení množství vznikajícího IC pohybovat v rozmezí od 0,4 do 1,3 mg/l (14), což představuje 2–6,5 % zkoušené chemické látky C při 20 mg C/l a 4–13 % při 10 mg C/l.

Povrchové vody

35. Odebere se vzorek vhodné povrchové vody. Vzorek se uchovává za aerobních podmínek a použije se v den odběru. Podle potřeby se vzorek koncentruje filtrací nebo odstředěním. Objem inokula, které má být použito v jednotlivých zkušebních nádobách, by měl splňovat kritéria uvedená v odstavci 26.

Půdy

36. Odebere se vzorek vhodné půdy do maximální hloubky 20 cm pod povrchem. Ze vzorku půdy se nejprve odstraní kameny, zbytky rostlin a bezobratlých a půda se následně proseje přes síto o velikosti oka 2 mm (v případě, že vzorek je příliš mokrý na to, aby ho bylo možné prosít okamžitě, částečně se usuší na vzduchu pro usnadnění prosévání). Vzorek se uchová v aerobních podmínkách a musí být použit v týž den, kdy byl odebrán. (Je-li vzorek přepravován ve volně uzavřeném černém polyethylenovém sáčku, lze jej v tomto sáčku skladovat při 2 až 4 °C po dobu až jednoho měsíce.)

Aklimatizace inokula

37. Inokulum lze aklimatizovat pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkoušenou chemickou látku. Aklimatizace může snížit uvolňování CO_2 ve slepých pokusech. Aklimatizace spočívá v aeraci aktivovaného kalu po jeho rozpuštění ve zkušebním médiu na 30 mg/l vlhkým vzduchem bez obsahu CO_2 po dobu 5 až 7 dnů při zkušební teplotě.

POSTUP ZKOUŠKY

Počet lahviček

38. Počet potřebných zkušebních lahviček (odstavec 15-a) závisí na četnosti analýz a na trvání testu.

39. Doporučuje se provést analýzu lahviček třikrát po uplynutí dostatečného počtu časových intervalů tak, aby bylo možno identifikovat desetidenní období rozkladu. Na konci zkoušky se rovněž analyzuje nejméně pět zkušebních lahviček (odstavec 15 písm. a)) ze sady a), b) a c) (viz odstavec 42) s cílem umožnit výpočet 95 % intervalů spolehlivosti pro průměrnou hodnotu biologického rozkladu v procentech.

▼M4

Inokulované médium

40. Inokulum se používá v koncentraci sušiny v aktivovaném kalu 4 mg/l. Dostatečně inokulované médium se připraví bezprostředně před použitím například přidáním 2 ml vhodně upraveného aktivovaného kalu (odstavce 27 až 32) na 2 000 mg/l na 1 litr média s minerálními solemi (odstavec 19). Při použití výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod se přidá až 100 ml odtoku (odstavec 33) do 900 ml média s minerálními solemi (odstavec 19) a zředí se médiem na 1 litr.

Příprava lahviček

41. Alikvotní díly inokulovaného média se rozdělí do duplikátních lahviček tak, aby se poměr mezi plynnou a kapalnou fází rovnal 1:2 (přidá se např. 107 ml do lahviček o kapacitě 160 ml). Lze použít i jiné poměry, ale je nutno dbát upozornění uvedeného v odstavci 11. Při použití jednoho i druhého typu inokula je nutno zajistit, aby bylo inokulované médium odpovídajícím způsobem promícháno s cílem zajistit jeho rovnoměrné rozdělení do zkušebních lahviček.

42. Připraví se sady lahviček (odstavec 15a), které budou obsahovat:

a) zkušební nádoby (označené F_T), obsahující zkoušenou chemickou látku;

b) nádoby pro slepé stanovení (označené F_B) obsahující jen zkušební médium a inokulum; je nutné přidat rovněž veškeré chemické látky, rozpouštědla, činidla nebo filtry ze skelných vláken užívané k zavedení zkoušené chemické látky do zkušebních nádob;

c) nádoby pro kontrolu postupu (označené F_C), obsahující referenční chemickou látku;

d) podle potřeby nádoby pro kontrolu možného inhibičního vlivu zkoušené chemické látky (označené F_I) obsahující zkoušenou chemickou látku a referenční chemickou látku ve stejné koncentraci (odstavec 24) jako v lahvích F_T (zkoušená látka) a F_C, (referenční látka);

e) nádoby pro kontrolu případného biotického rozkladu (označeného F_S), jako v bodě a) plus 50 mg/l $HgCl_2$, nebo sterilizované jiným způsobem (např. v autoklávu).

43. Ve vodě rozpustné zkoušené chemické látky a referenční chemické látky se přidají jako vodné zásobní roztoky (odstavce 22, 23 a 24) tak, aby výsledná koncentrace byla 10 až 20 mg C/l.

44. Nerozpustné zkoušené chemické látky a nerozpustné referenční chemické látky se přidávají do lahviček celou řadou různých způsobů (viz odstavec 22a-e) v závislosti na povaze zkoušené látky, a to buď před přidáním inokulovaného média, nebo po něm v závislosti na metodě expozice zkoušené chemické látky. Pokud se užije některý z postupů uvedených v odstavci 22a-e, bude se slepými lahvičkami F_B (odstavec 42b) zacházeno podobným způsobem, avšak bez přidání zkoušené chemické látky nebo referenční chemické látky.

45. Těkavé zkoušené chemické látky je třeba vstříknout do uzavřených lahviček (bod 47) s použitím injekční mikrostříkačky. Dávka se vypočítá ze vstříknutého objemu a z hustoty zkoušené chemické látky.

46. Potom se v případě potřeby do nádob přidá voda tak, aby objem kapaliny byl ve všech nádobách stejný. Poměr mezi plynnou a kapalnou fází (obvykle 1:2) a koncentrace zkoušené látky musí zajistit dostatečnou koncentraci kyslíku v plynné fázi pro úplný biologický rozklad.

▼M4

47. Všechny lahve se poté těsně uzavřou, například pryžovými septy z butylkaučuku a hliníkovými lemovacími uzávěry. V této fázi jsou přidány těkavé zkoušené chemické látky (bod 45). Pokud má být sledován pokles koncentrace DOC ve zkušebním roztoku a provedeny analýzy počáteční koncentrace IC v čase nula (sterilní kontroly, bod 42e) nebo jiné determinanty, příslušný vzorek se odstraní ze zkušební nádoby. Zkušební nádoba a její obsah jsou pak vyřazeny.

48. Těsně uzavřené lahvičky se umístí na orbitální třepačku (odstavec 15d) při rychlosti zajišťující dostatečné promíchání obsahu zkušebních nádob a v suspenzi (např. 150 až 200 otáček za minutu), a jsou inkubovány v temnu při teplotě 20 °C ± 1 °C.

Odběr vzorků

49. Vzorec odběru vzorků závisí na trvání lagové fáze a na kinetické rychlosti biologického rozkladu zkoušené chemické látky. Vybrané nádoby se analyzují v den vzorkování, ale nejméně jednou za týden nebo častěji (např. dvakrát týdně), jestliže se požaduje celková křivka biologické rozložitelnosti. Z třepačky se odstraní potřebný počet opakovaných vzorků odpovídajících F_T, F_B a F_C a pokud byly nasazeny také F_I a F_S (viz odstavec 42). Zkouška musí obvykle probíhat 28 dní. Zkouška může být ukončena před uplynutím 28 dní, jestliže z křivky biologické rozložitelnosti vyplývá, že prodlevy bylo dosaženo již dříve. Odeberou se vzorky pro analýzu z pěti lahví rezervovaných pro 28. den zkoušky a výsledky se použijí k výpočtu mezí spolehlivosti nebo variačního koeficientu procenta biologického rozkladu. Z lahviček představujících kontrolní vzorky pro inhibici a abiotický rozklad nemusí být vzorky odebírány tak často jako z ostatních lahviček; postačí odběr v 1. den a v 28. den.

Analýza anorganického uhlíku (IC)

50. Produkce CO_2 v lahvičkách se stanoví měřením zvýšení koncentrace anorganického uhlíku (IC) v průběhu inkubace. Existují dvě doporučené metody stanovení množství IC vznikajícího během zkoušky, které jsou popsány bezprostředně níže. Tyto metody mohou poskytovat poněkud odlišné výsledky, a proto by během zkoušky měla být používána jen jedna z nich.

51. Metoda a) se doporučuje v případě, že médium pravděpodobně obsahuje zbytky například skleněného filtračního papíru a/nebo nerozpustné zkoušené chemické látky. Pokud není k dispozici analyzátor uhlíku, lze tuto analýzu provést pomocí plynového chromatografu. Je důležité, aby láhve měly při analýze plynu v plynné fázi zkušební teplotu nebo se jí alespoň blížily. Metoda b) může být jednodušší pro laboratoře, které užívají pro měření IC analyzátory uhlíku. Je důležité, aby roztok hydroxidu sodného (odstavec 21), který slouží k přeměně CO_2 na uhličitan, byl buď čerstvě připravený, nebo byl znám jeho obsah IC, aby jej bylo možno zohlednit při výpočtu výsledků zkoušek (viz odstavec 66-b).

Metoda a): okyselení na hodnotu pH < 3

52. Před analýzou každé šarže se analyzátor uhlíku kalibruje vhodným IC standardem (např. dusíkem s hmotnostním podílem CO_2 1 %). Septem se vstříkne do každé zkušební nádoby koncentrovaná kyselina fosforečná (odstavec 20), aby se hodnota pH média snížila na < 3 (přidá se například 1 ml kyseliny na každých 107 ml zkušebního média). Potom se nádoby znovu umístí na třepačku. Po 1 h třepání při zkušební teplotě se nádoby sejmou z třepačky a z každé zkušební nádoby se odebere alikvotní podíl (např. 1 ml) plynné fáze a vstříkne se do analyzátoru uhlíku. Zaznamenají se naměřené koncentrace IC (v mg C na litr plynu).

▼M4

53. Podstata této metody spočívá v tom, že po okyselení na pH < 3 a po dosažení rovnováhy při 20 °C je rovnovážná konstanta pro distribuci CO_2 mezi kapalnou a plynnou fází ve zkušebních nádobách rovna 1,0, pokud je měřena jako koncentrace (13). To by mělo být nejméně jednou ověřeno pro zkušební systém následujícím způsobem:

Připraví se zkušební nádoby obsahující roztok bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) ve vodě prosté CO_2 o koncentracích odpovídajících 5 a 10 mg IC na litr, přičemž voda prostá CO_2 se připraví okyselením vody na pH 6,5 koncentrovanou kyselinou orthofosforečnou (odstavec 20), kterou se přes noc prohání vzduch prostý CO_2 a nakonec se pH sníží přidáním zásady na neutrální hodnotu. Zajistí se, aby poměr mezi plynnou a kapalnou fází byl stejný jako při vlastní zkoušce (např. 1:2). Obsah v nádobách se okyselí a po dosažení rovnováhy, jak je uvedeno v odstavci 52, se stanoví koncentrace IC v plynné i kapalné fázi. Ověří se, zda v rámci experimentální chyby jsou obě koncentrace stejné. V případě, že tomu tak není, experimentátor by měl uvedené postupy přehodnotit. Tuto kontrolu distribuce IC mezi plynnou a kapalnou fází není nutné provádět vždy při provedení testu; lze ji provádět nejspíše při provádění kalibrace.

54. Jestliže má být stanoven úbytek DOC (platí pouze pro vodou rozpustné zkoušené chemické látky), odeberou se vzorky kapalné fáze ze samostatných (neokyselených) nádob, filtrují se membránovým filtrem a vstříknou do DOC analyzátoru. Tyto nádoby lze podle potřeby užít pro další analýzy s cílem stanovit primární biologický rozklad.

Metoda b): přeměna CO_2 na uhličitany

55. Před analýzou každé šarže se analyzátor IC kalibruje na vhodný standard – například roztokem hydrogenuhličitanu sodného ($NaHCO_{3)}$ ve vodě prosté CO_2 (viz odstavec 53) v koncentračním rozsahu IC od 0 mg/l do 20 mg/l. Septem se do každé zkušební lahvičky vstříkne 1 ml roztoku hydroxidu sodného (7M, odstavec 21) (např. 1 ml do 107 ml média) a nádobami se třepe při zkušební teplotě po dobu 1 h. Tentýž roztok NaOH se použije pro všechny lahvičky užité v daném dni, avšak není nutno jej užívat při každém odběru vzorků v průběhu zkoušky. Jestliže jsou při všech odběrech vzorků požadovány absolutní slepé hodnoty IC, bude stanovení IC v roztoku NaOH požadováno při každém jeho použití. Nádoby se sejmou z třepačky a nechají se odsadit. Z každé nádoby se stříkačkou odebere vhodný objem kapalné fáze (např. od 50 µl do 1 000 µl). Vzorky se vstříknou do analyzátoru IC a zaznamenají se koncentrace IC. Je třeba zajistit, aby užívaný analyzátor byl řádně vybaven ke zpracování zásaditých vzorků vytvořených v rámci této metody.

56. Podstata této metody spočívá v tom, že po přídavku zásady a třepání je koncentrace IC v plynné fázi zanedbatelná. To by mělo být ověřeno pro zkušební systém nejméně jednou s použitím standardů IC, přidáním zásady a ustálením a změřením koncentrace IC v plynné i kapalné fázi (viz odstavec 53). Koncentrace v plynné fázi by se měla blížit nule. Tuto kontrolu na téměř kompletní absorpci CO_2 není nutno provádět při každé zkoušce.

57. Jestliže má být stanoven úbytek DOC (platí pouze pro vodou rozpustné zkoušené chemické látky), odeberou se vzorky kapalné fáze ze samostatných nádob (které neobsahují přidanou zásadu), filtrují se membránovým filtrem a vstříknou do DOC analyzátoru. Tyto nádoby lze podle potřeby užít pro další analýzy s cílem stanovit primární biologickou rozložitelnost.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Výpočet výsledků

58. Za předpokladu 100 % mineralizace zkoušené chemické látky na CO_2 se teoretická produkce anorganického uhlíku (ThIC), která je větší než produkovaná slepým stanovením, rovná množství celkového organického uhlíku (TOC) přidaného do každé zkušební nádoby na začátku zkoušky, takže:

$$ThIC = TOC.$$

Celkový objem anorganického uhlíku (TIC) v každé zkušební nádobě je:

$$TIC = (\text{mg C v kapalné fázi} + \text{mg C v plynné fázi}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{rovnice [1]}$$

kde:

V_L = objem kapaliny v láhvi (v litrech),

CL = koncentrace IC v kapalné fázi (v mg uhlíku na 1 litr kapalné fáze),

VH = objem plynné fáze (v litrech),

CL = koncentrace IC v plynné fázi (v mg uhlíku na 1 litr plynné fáze).

Výpočet TIC pro tyto dvě analytické metody užívané ke stanovení IC při této zkoušce je popsán níže v odstavcích 60 a 61. Procento biologického rozkladu (*% D*) se pro každý případ vypočte podle:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Rovnice [2]}$$

kde:

TIC_t = TIC ve zkušební nádobě v čase t v miligramech,

TIC_b = průměrná hodnota TIC v nádobách pro slepé stanovení v čase t v miligramech,

TOC = TOC původně přidaný do zkušební nádoby v miligramech.

Procento biologického rozkladu % D se vypočte ve zkušebních nádobách (F_T), referenčních nádobách (F_C) a nádobách pro kontrolu inhibice z příslušného množství TIC produkovaného při každé době odběru vzorku (pokud byly zařazeny).

59. Jestliže došlo během zkušební doby k významnému vzrůstu TIC sterilních kontrol (F_S), pak lze dospět k závěru, že došlo k abiotickému rozkladu zkoušené chemické látky a tuto skutečnost je třeba zohlednit ve výpočtu D v rovnici [2].

Okyselení na hodnotu pH < 3

60. Vzhledem k tomu, že okyselení na hodnotu pH < 3 a ustálení má za následek dosažení rovnováhy mezi koncentrací TIC v kapalné a plynné fázi, stačí měřit jen koncentraci IC v plynné fázi. Proto je v rovnici [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kde V_B = je objem lahve se sérovým uzávěrem.

Přeměna CO_2 na uhličitany

61. Při této metodě se výpočty provádějí, jak je popsáno v rovnici [1], avšak zanedbatelný obsah IC v plynné fázi se nebere v úvahu, to znamená, že $V_H \times C_H = 0$, a $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Vyjadřování výsledků

62. Křivka biologického rozkladu se získá vynesením závislosti procenta biologického rozkladu D na čase inkubace, a pokud možno se vyznačí také lagová fáze, doba biologického rozkladu, 10denní období rozkladu a prodleva, tj. fáze, v níž bylo dosaženo maximálního rozkladu a v níž se vyrovnala křivka biologického rozkladu. Jestliže se pro dvě souběžná stanovení ve zkušebních nádobách F_T (rozdíl menší než 20 %) získají srovnatelné výsledky, vynesou se do grafů průměrné hodnoty (viz dodatek 2, obr. 1); v opačném případě se vynesou křivky pro každou nádobu zvlášť. Zjistí se průměrná hodnota biologického rozkladu v procentech v prodlevě nebo se odhadne nejvyšší hodnota (například když křivka v prodlevě klesá), ale je důležité stanovit, že v tomto druhém případě se nejedná o odlehlou hodnotu. Tento maximální stupeň biologického rozkladu se v protokolu o zkoušce uvede jako „stupeň biologického rozkladu zkoušené chemické látky“. Jestliže počet zkušebních nádob nebyl dostatečný pro odhad prodlevy, použijí se údaje změřené poslední den zkoušky a vypočte se průměrná hodnota. Tato poslední hodnota, průměr pěti opakovaných zkoušek, slouží jako indikátor přesnosti, s nímž bylo stanoveno procento biologického rozkladu. Uvede se rovněž hodnota získaná na konci 10denního období rozkladu.

63. Stejným způsobem se vynese křivka biologického rozkladu pro referenční látku F_C, a pokud byla provedena, i pro závislost abiotické eliminace F_S a kontroly inhibice F_I.

64. Zaznamená se produkce TIC při slepém stanovení (F_B) a v nádobách pro kontrolu abiotické eliminace (F_S), pokud byly tyto nádoby zařazeny do zkoušky.

65. Vypočte se D pro nádoby F_I na základě teoretické produkce IC předpokládané pouze na základě referenční složky směsi. Jestliže je 28. den $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, lze předpokládat, se zkoušená chemická látka působí inhibičně na aktivitu inokula, a to může být důsledkem nízkých hodnot D_{FT} získaných za podmínek zkoušky. V tomto případě by mohla být zkouška opakována s nižší zkušební koncentrací, a pokud možno se snížením DIC v inokulu a TIC vytvořeného ve slepých kontrolních nádobách vzhledem k tomu, že nižší koncentrace jinak sníží přesnost této metody. V úvahu přichází i použití jiného inokula. Jestliže v nádobě F_S (abiotické) byl pozorován významný nárůst (> 10 %) množství TIC, mohou přicházet v úvahu procesy abiotického rozkladu.

Platnost výsledků

66. Zkouška se považuje za platnou, jestliže:

a) průměrné procento rozkladu v nádobách F_C s referenční látkou je po 14 dnech inkubace > 60 % a

b) průměrná produkce TIC při slepých stanoveních F_B na konci zkoušky je > 3 mg C/l.

Pokud není těchto limitů dosaženo, měla by se zkouška opakovat s inokulem z jiného zdroje, případně by měl být přezkoumán užitý postup. Pokud je například problémem vysoká produkce IC při slepých stanoveních, je nutno opakovat postup uvedený v odstavcích 27 až 32.

(1) Procento rozkladu v nádobách F_C obsahujících referenční látku.
(2) Procento rozkladu v nádobách F_I.

▼M4

67. Pokud zkoušená látka nedosáhne 60 % ThIC a bylo prokázáno, že není inhibující (odstavec 65), lze zkoušku opakovat s vyšší koncentrací inokula (až 30 mg/l aktivovaného kalu a 100 ml odtoku/l) nebo s inokuly z jiných zdrojů, zejména tehdy, pokud byl rozklad v rozmezí 20 až 60 %.

Interpretace výsledků

68. Biologický rozklad > 60 % ThIC v rámci 10denního období rozkladu v této zkoušce prokazuje, že zkoušená chemická látka je snadno biologicky rozložitelná v aerobních podmínkách.

69. Pokud není dosaženo vyhovující hodnoty 60 % ThIC, určí se hodnota pH v médiích v lahvičkách, které nebyly upraveny kyselinou ani zásadou; hodnota menší než 6,5 by mohla znamenat, že došlo k nitrifikaci. V takovém případě se zkouška opakuje s roztokem pufru o vyšší koncentraci.

Protokol o zkoušce

70. Sestaví se tabulka % D pro každou zkušební nádobu (F_T), referenční nádobu (F_C) a nádobu pro kontrolu inhibice (F_I), pokud byly zařazeny do vzorku, pro každý den odběru vzorku. Pokud jsou získány srovnatelné výsledky pro duplikátní vzorky, vynese se křivka průměrných hodnot % D v reálném čase. Zaznamená se množství TIC ve slepých (F_B) a sterilních kontrolách (F_S) DOC a/nebo jiné determinanty a jejich procento úbytku.

71. Určí se průměrná hodnota procenta D ve fázi prodlevy, nebo se použije nejvyšší hodnota, pokud křivka biologického rozkladu ve fázi prodlevy klesá, a tato skutečnost se uvede jako „stupeň biologického rozkladu zkoušené chemické látky“. Je důležité zajistit, aby v tomto druhém případě nejvyšší hodnota nebyla hodnotou odlehlou.

72. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot).

Zkušební podmínky:

— odkaz na tuto zkušební metodu,

— popis užitého zkušebního systému (např. objem nádoby, poměr mezi plynnou a kapalnou fází, metoda míchání atd.),

— aplikace zkoušené chemické látky a referenční chemické látky do zkušebního systému: užitá zkušební koncentrace a množství uhlíku dávkovaného do jednotlivých zkušebních nádob; jakékoli užití rozpouštědla,

— podrobnosti o použitém inokulu, jakákoli adaptace a aklimatizace,

— teplota inkubace,

— validace principu analýzy IC,

— hlavní charakteristika použitého analyzátoru IC (a jakýchkoli dalších použitých analytických metod),

— počet duplikátních vzorků.

Výsledky:

— nezpracovaná data a vypočtené hodnoty biologického rozkladu v tabelární formě,

▼M4

— graf závislosti procenta rozkladu na čase u zkoušených a referenčních chemických látek, lagová fáze, fáze rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnice,

— procento úbytku ve fázi prodlevy, na konci zkoušky a po uplynutí 10denního období rozkladu,

— odůvodnění případného odmítnutí výsledků zkoušky,

— jakékoli další skutečnosti, které jsou důležité pro užitý postup,

— diskuse o výsledcích.

LITERATURA:

1) Kapitola C.4 této přílohy – Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti – Zkouška na uvolňování CO_2 (metoda C.4-C).

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; přepracována v roce 1999). Jakost vod – Hodnocení úplné biologické rozložitelnosti organických látek ve vodném prostředí – Metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16) ISO 14593, (1999) Jakost vod – Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí – Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách ($C0_2$ headspace metoda).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835,3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Kapitola C.4 této přílohy – Stanovení „snadné" biologické rozložitelnosti.

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Kapitola C.11 této přílohy – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu.

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Jakost vod – Pokyny pro přípravu a zpracování ve vodě těžko rozpustných organických látek pro následující hodnocení jejich biologické rozložitelnosti ve vodním prostředí.

▼M4

Dodatek 1

ZKRATKY A DEFINICE

IC: Anorganický uhlík (*Inorganic carbon*).

TCO_2: Teoretický oxid uhličitý (theoretical carbon dioxide, $ThCO_2$) (mg) je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené chemické látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se rovněž v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo zůstane v supernatantu po odstřeďování po dobu 15 minut při odstředivém zrychlení 40 000 m/s^{-2} (což odpovídá odstředivé síle přibližně 4 000 g)

DIC: Rozpuštěný anorganický uhlík.

ThIC: Teoretická produkce anorganického uhlíku.

TIC: Celkový anorganický uhlík.

Snadno biologicky rozložitelná: je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly určitými screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

10denní období rozkladu: je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % biologického rozkladu.

Biologická rozložitelnost: je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Úplný aerobní biologický rozklad: je stupeň rozkladu zkoušené látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Mineralizace: Mineralizace je úplný rozklad organické látky na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek.

Lagová fáze: Čas od začátku zkoušky až do doby dosažení aklimatizace a/nebo adaptace rozkládajících se mikroorganismů a vzrůstu stupně biologického rozkladu zkoušené chemické látky nebo organické chemické látky na detekovatelnou úroveň (např. 10 % maxima teoretického biologického rozkladu nebo nižší v závislosti na přesnosti techniky měření).

Doba rozkladu: Doba od konce lagové fáze až do doby, kdy bylo dosaženo 90 % maximálního stupně biologického rozkladu.

Prodleva (plato): Prodleva je fáze, kdy bylo dosaženo maximálního rozkladu a křivka biologického rozkladu se ustálila.

Zkoušená chemická látka: Jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

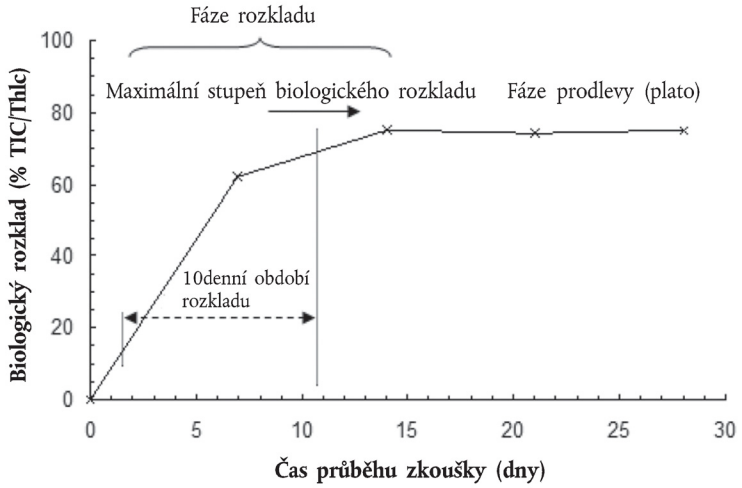
▼M4

Dodatek 2

Příklad křivky biologického rozkladu

Obrázek 1

Biologický rozklad oktan-1-olu CO_2 headspace metodou



Slovníček

Biologický rozklad:

Fáze rozkladu:

Maximální stupeň biologického rozkladu:

Fáze prodlevy (plato):

10denní období rozkladu:

Čas průběhu zkoušky (dny):

▼M4

C. 30 **BIOAKUMULACE U TERESTRICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCŮ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 317 (2010). Ze zkušebních metod týkajících se rozpadu v životním prostředí byly v roce 1996 publikovány Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách (kapitola C.13 této přílohy (49)) a v roce 2008 Bioakumulace u bentických máloštětinatců žijících v sedimentu (53). Extrapolovat údaje o bioakumulaci ve vodním prostředí na suchozemské organismy, jako jsou žížaly, je obtížné až nemožné. Pro stanovení bioakumulace chemických látek v půdě se v současné době užívají modelové výpočty založené na lipofilitě zkoušené chemické látky, např. (14, 37), jako např. v technických pokynech EU (19). Potřeba zkušební metody specifické pro určité prostředí již byla vyřešena, např. (55). Tato metoda je zvláště důležitá pro posouzení druhotné otravy v terestrických potravních řetězcích (4). Několik vnitrostátních zkušebních metod řeší problém bioakumulace u jiných organismů než u ryb, např. (2) a (72). Jednu z metod měření bioakumulace z kontaminovaných půd v žížalách (Eisenia fetida, Savigny) a kroužkovcích vyvinula Americká společnost pro zkoušení a materiály (3). Mezinárodně uznávaná metoda pro stanovení bioakumulace v obohacené půdě zlepší posuzování rizik, která představují chemické látky pro terestrické ekosystémy, např. (25, 29).

2. Půdu přijímající bezobratlí jsou exponováni chemickým látkám vázaným v půdě. Mezi tyto živočichy patří terestričtí máloštětinatci, kteří hrají významnou úlohu ve struktuře a funkci půdy (15), (20). Terestičtí máloštětinatci žijí v půdě a částečně na jejím povrchu (zejména ve vrstvě L) a často reprezentují nejpočetnější druh, pokud jde o biomasu (54). Jelikož tito živočichové víří půdu a slouží jako potrava, mohou mít silný vliv na biologickou dostupnost látek pro jiné organismy, jako jsou bezobratlí (např. draví roztoči a brouci, např. (64)) nebo dravci (např. lišky a racci) z řad obratlovců (18, 62). Některé druhy terestrických máloštětinatců, kteří jsou v současné době využíváni pro ekotoxikologické zkoušky, jsou popsány v dodatku 5.

3. Řadu podstatných a užitečných údajů pro provedení této zkušební metody bioakumulace v půdě poskytuje dokument „ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus“ 3). Dalšími dokumenty, na které tato zkušební metoda odkazuje, je kapitola C.13 této přílohy Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách (49) a OECD TG 315: Bioakumulace u bentických máloštětinatců žijících v sedimentu (53). Významným zdrojem informací pro tuto zkušební metodu jsou rovněž praktické zkušenosti se studiemi bioakumulace v půdě a publikovaná literatura, např. (1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78, 79).

4. Tato metoda je vhodná zejména pro testování stabilních, neutrálních organických chemických látek, které mají tendenci k adsorpci na půdu. Touto zkušební metodou lze rovněž testovat bioakumulaci s půdou spjatých stabilních organokovových sloučenin. Lze ji použít i pro kovy a jiné stopové prvky.

PŘEDPOKLADY

5. Zkoušky pro měření bioakumulace chemické látky v pozemních máloštětinatcích byly provedeny s těžkými kovy (viz např. (63)) a persistentními organickými chemickými látkami, jejichž hodnoty log K_{ow} se pohybují mezi 3,0 a 6,0 např. (40). Tyto zkoušky lze použít také pro:

— chemické látky, které mají log K_{ow} vyšší než 6,0 (superhydrofobní chemické látky),

▼M4

— chemické látky, které patří do kategorie organických látek, o nichž je známo, že mají potenciál bioakumulace v živých organismech, např. povrchově aktivní nebo vysoce adsorpční chemické látky,

— chemické látky, které vykazují potenciál pro bioakumulaci na základě strukturálních prvků, např. analogy chemické látky se známým bioakumulačním potenciálem, a

— kovy.

6. Informace o zkoušené chemické látce, jako je obecný název, chemický název, (optimálně název podle IUPAC), strukturní vzorec, registrační číslo CAS, čistota, bezpečnostní opatření, vhodné podmínky skladování a analytické metody, by měly být získány před zahájením studie. Kromě toho by měly být známy tyto údaje:

a) rozpustnost ve vodě;

b) rozdělovací koeficient oktanol-voda K_{ow};

c) rozdělovací koeficient půda-voda vyjádřený jako K_{oc};

d) tlak par;

e) rozložitelnost (např. v půdě, ve vodě);

f) známé metabolity.

7. Lze použít radioizotopově značené i neznačené zkoušené chemické látky. Pro usnadnění analýzy se však doporučuje použít radiotopově značenou zkoušenou chemickou látku. Rozhodnutí bude záviset na mezích stanovitelnosti nebo na požadavku na měření výchozí zkoušené chemické látky a metabolitů. Je-li použita radioizotopově značená zkoušená látka a měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku, je pro výpočet bioakumulačního faktoru (BAF) výchozí chemické látky a příslušných půdních metabolitů (viz odstavec 50) důležité, aby radioizotopově značené zbytky v půdě i ve zkušebních organismech a testovací organismy byly charakterizovány procentem výchozí zkoušené chemické látky a značené nevýchozí chemické látky, např. ve vzorcích odebraných v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu. U měření radioaktivně neznačené organické zkoušené látky nebo kovů může být nutné popsanou metodu upravit například tak, aby vzniklo dostatečné množství biomasy. Měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku (počítáním scintilací v roztoku například po extrakci, spálení nebo solubilizaci tkáně), je hodnota bioakumulačního faktoru založena na výchozí zkoušené chemické látce a na metabolitech. Výpočet BAF by měl být přednostně založen na koncentraci výchozí zkoušené chemické látky v organismech a na celkovém objemu radioaktivních zbytků. Následně by měl být na základě BAF vypočten akumulační faktor sediment-biota (BSAF) normalizovaný na obsah lipidů v červech a obsah organického uhlíku (OC) v půdě z důvodů srovnatelnosti mezi výsledky různých bioakumulačních zkoušek.

8. Měla by být známa toxicita zkoušené látky pro druh použitý při zkoušce, například koncentrace vyvolávající účinek (EC_x) nebo letální koncentrace (LC_x) po dobu fáze příjmu (např. (19)). Zvolená koncentrace zkoušené látky by měla v optimálním případě být na úrovni 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50} a měla by být nejméně desetkrát vyšší než je mez detekce této látky v půdě při použité analytické metodě. Pokud je to možné, měla by být dána přednost hodnotám toxicity odvozeným z dlouhodobých studií o subletálních koncových bodech (51, 52). Pokud tyto údaje nejsou k dispozici, poskytne užitečné informace zkouška akutní toxicity (viz např. (23)).

▼M4

9. K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé správnosti, přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení chemické látky ve zkušebních roztocích, v půdě a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků a materiálové bezpečnostní listy. Měly by být také známy meze stanovitelnosti zkoušené látky jak v půdě, tak v tkáních červů. Je-li použita zkoušená látka značená ^{14}C, měla by být známá specifická radioaktivita ((tj. Bq/mol) a aktivita nečistot vyjádřená v procentech. Specifická radioaktivita zkoušené chemické látky by měla být dostatečně vysoká, aby umožňovala analýzu a použité zkušební koncentrace by neměly vyvolávat toxické účinky.

10. Zkoušku je možno provést s umělou půdou nebo s přírodními půdami. U přírodních půd je před zahájením zkoušky třeba znát informace o vlastnosti užité přírodní půdy, jako je například původ půdy nebo jejích složek, pH, obsah organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu) a vodní kapacita (WHC) (3, 48).

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Mezi parametry, které charakterizují bioakumulaci zkoušené chemické látky, patří bioakumulační faktor (BAF), rychlostní konstanta příjmu (k_s) a rychlostní konstanta vylučování (k_e). Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

12. Zkouška se skládá ze dvou fází: fáze příjmu (expozice) a vylučovací (poexpoziční) fáze. Ve fázi příjmu jsou paralelní vzorky červů vystaveny působení půdy, která byla obohacena zkoušenou chemickou látkou. Zároveň se zkušebními organismy je za stejných podmínek, ale bez zkoušené chemické látky držena kontrolní skupina červů. Měří se hmotnost po vysušení a obsah lipidů ve zkušebních organismech. To lze provést pomocí červů v kontrolní skupině. Analytické hodnoty pozadí (slepé) lze získat analýzou vzorků červů z kontrolní skupiny a půdy. Ve fázi vylučování jsou červi přemístěni do půdy bez zkoušené chemické látky. Fáze vylučování je nutná vždy s výjimkou případů zanedbatelné absorpce zkoušené chemické látky v průběhu fáze expozice. Fáze vylučování poskytuje informace o míře vylučování testované látky zkušebními organismy (např. (27)). Pokud nebylo ve fázi příjmu dosaženo ustáleného stavu, mělo by být stanovení kinetických parametrů – kinetického bioakumulačního faktoru BAF_K a rychlostní konstanty (rychlostních konstant) příjmu a vylučování – založeno v optimálním případě na současném proložení výsledků fáze příjmu a fáze vyprázdnění. Koncentrace zkoušené látky v červech a na nich je sledována v průběhu obou fází zkoušky.

13. Během fáze příjmu se provádí měření v době odběru vzorků po dobu až 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), dokud není dosaženo ustáleného stavu (11, 12, 67). Ustálený stav nastává, jestliže vynesení koncentrace červů v čase je rovnoběžné s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy koncentrací provedené na vzorcích odebraných nejméně v dvoudenních intervalech se vzájemně neliší o více než ± 20 % na základě statistických srovnání (např. analýza rozptylu, regresní analýza).

14. Fáze vylučování spočívá v přenesení zkušebních organismů do nádob, které obsahují stejný substrát bez obsahu zkoušené chemické látky. V průběhu fáze vyprázdnění se měření provádějí v době odběru vzorků po dobu až 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), pokud již dříve nebylo analyticky stanoveno 90 % snížení reziduí zkoušené chemické látky v červech. Koncentrace zkoušené chemické látky v červech na konci fáze vyprázdnění se uvede jako neodstraněná rezidua. Bioakumulační faktor ustáleného stavu

▼M4

(BAF_{SS}) se optimálně vypočte jako poměr koncentrace v červech (C_a) a v půdě (C_s) ve zřetelném ustáleném stavu, a jako kinetický bioakumulační faktor BAF_K, tj. poměr rychlostní konstanty příjmu z půdy (k_s) a rychlostní konstanty vylučování (k_e) (definice viz dodatek 1) za předpokladu kinetiky prvního řádu (výpočty viz dodatek 2). Pokud kinetiku prvního řádu zjevně nelze použít, měly by být použity jiné modely.

15. Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování, kinetický bioakumulační faktor (BAF_K) a, je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelových rovnic za použití počítače (návod viz dodatek 2). Oprávněnost jakéhokoli modelu lze určit např. z korelačního koeficientu nebo z koeficientu determinace (koeficienty, jejichž hodnota se blíží jedné, indikují oprávněnost), nebo na základě druhé mocniny chí (χ^2). Také velikost standardní odchylky nebo intervalu spolehlivosti kolem odhadovaných parametrů mohou svědčit o oprávněnosti modelu.

16. Ke snížení rozptylu výsledků zkoušek pro zkoušené chemické látky s vysokou lipofilností by měly být bioakumulační faktory vyjádřeny ve vztahu k obsahu lipidů a obsahu organického uhlíku (kg organického uhlíku v půdě (OC) na kg lipidů v červech). Tento přístup je založen na skutečnosti, že u některých skupin chemických látek existuje jasný vztah mezi potenciálem bioakumulace a lipofilností, což je široce používáno v případě ryb (47). Existuje vztah mezi obsahem lipidů v rybách a bioakumulací těchto chemických látek. U bentických organismů byly zjištěny podobné korelace např. (30, 44). Obdobně byla tato korelace prokázána u terestrických máloštětinatců, např. (5, 6, 7, 14). Pokud je k dispozici dostatečné množství tkání červů, lze stanovit obsah lipidů u pokusných živočichů na stejném biologickém materiálu, který byl použit ke stanovení koncentrace zkoušené chemické látky. Ke stanovení obsahu lipidů lze použít rovněž kontrolní živočichy.

PLATNOST ZKOUŠKY

17. Má-li být zkouška platná, musí být při kontrole i expozici splněny následující podmínky:

— Celková úmrtnost ve fázi příjmu a ve fázi vyprázdnění nesmí na konci zkoušky překročit 10 % (žížaly) nebo 20 % (roupice) z celkového počtu vložených červů.

— Průměrná ztráta hmotnosti u *Eisenia fetida a Eisenia andrei* měřená na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování by neměla přesáhnout 20 % v porovnání s původní čerstvou hmotností (f.w.) na začátku každé fáze.

POPIS METODY

Testovací druh

18. Pro zkoušky bioakumulace se doporučuje používat několik druhů terestrických máloštětinatců. Nejběžněji používané druhy *Eisenia fetida* nebo *Eisenia Andrei* (Lumbricidae) nebo *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus*, nebo *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae)) jsou popsány v dodatku 5.

▼M4

Přístroje a pomůcky

19. U všech částí zařízení je třeba se vyhýbat použití materiálů, které se mohou rozpouštět, adsorbovat zkoušenou chemickou látku nebo vyluhovat jiné chemické látky a mají nepříznivý účinek na pokusné živočichy. Lze použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádrže vyrobené z chemicky inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na náplň, tj. počet zkušebních červů. Veškeré vybavení, které se dostane do styku se zkušebním médiem, může být vyrobeno z korozivzdorné oceli, plastu nebo skla. Zkušební nádoby by měly být vhodným způsobem zakryty, aby se zabránilo úniku červů, přičemž je nutné zajistit dostatečný přívod vzduchu. Pro látky s vysokými adsorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, může být nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno (49). U radioaktivně značených zkoušených látek a těkavých chemických látek je nutné zabránit jejich úniku. Je nutno použít lapače (např. skleněné promývačky plynu) obsahující vhodný absorbent schopný udržet zbytky odpařující se ze zkušebních nádob.

Půda

20. Zkušební půda by měla mít takovou kvalitu, která umožní přežití zkušebních organismů, a pokud možno jejich reprodukci po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazovaly abnormální vzhled nebo chování. Červi by se měli zavrtat do půdy.

21. Jako zkušební substrát se doporučuje užít umělou půdu popsanou v kapitole C.8 této přílohy (48). Příprava umělé půdy pro použití při zkouškách bioakumulace a doporučení pro skladování umělé půdy jsou uvedeny v příloze 4. Umělou půdu vysušenou na vzduchu lze uchovávat při pokojové teplotě až do použití.

22. Jako zkušební a/nebo kultivační půdu však lze použít i přírodní půdu z neznečištěných lokalit. Přírodní půdy by měly být charakterizovány alespoň podle původu (místa odběru), pH, obsahu organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu), maximální vodní kapacity (WHC_{max}) a procenta obsahu vody (3). Užitečné informace by měla poskytnout analýza půdy nebo jejích složek na mikroskopické znečišťující látky před použitím. Pokud se využívá zemědělská půda z pole, neměla by být ošetřena přípravky na ochranu rostlin ani hnojem od exponovaných zvířat jako hnojivem po dobu nejméně jednoho roku a organickými hnojivy po dobu nejméně šesti měsíců před odběrem vzorku (50). Postupy manipulace s přírodními půdami před použitím při ekotoxikologických laboratorních zkouškách na máloštětinatcích jsou popsány v bodě (3). U přírodní půdy by doba skladování v laboratoři měla být co nejkratší.

Aplikace zkoušené chemické látky

23. Zkoušená chemická látka se přidá do půdy. Měly by být vzaty v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky. Ve vodě rozpustná zkoušená chemická látka by měla být před smísením s půdou zcela rozpuštěna ve vodě. Doporučený postup vmíchávání těžko rozpustných zkoušených chemických látek zahrnuje obalení jedné nebo více složek (umělé) půdy zkoušenou chemickou látkou. Například křemenný písek nebo jeho část se ponoří do roztoku zkoušené chemické látky ve vhodném organickém rozpouštědle, které se pak pomalu odpaří do sucha. Obalenou frakci lze následně promíchat s vlhkou půdou. Hlavní výhodou tohoto postupu je, že se do půdy nevpravují žádná rozpouštědla. Je-li použita přírodní půda,

▼M4

lze zkoušenou chemickou látku přidat vmícháním části půdy vysušené na vzduchu, jak bylo popsáno výše u umělé půdy, nebo vmícháním zkoušené chemické látky do vlhké půdy s následným odpařováním, pokud bylo použito solubilizační činidlo. Obecně platí, že je třeba pokud možno se vyhnout kontaktu vlhké půdy s rozpouštědly. Je třeba zvážit následující skutečnosti (3):

— Užije-li se jiné rozpouštědlo než voda, mělo by být takové, aby bylo mísitelné s vodou a/nebo odbouratelné (například odpařením) tak, že v půdě zůstane jen zkoušená chemická látka.

— Použije-li se kontrola rozpouštědla, není nutno provést negativní kontrolu. Kontrola rozpouštědla by měla obsahovat nejvyšší koncentraci rozpouštědla přidávaného do půdy a mělo by při ní být užito rozpouštědla ze stejné šarže, která byla použita pro zásobní roztok. Hlavním kritériem pro výběr vhodného solubilizačního činidla by měla být toxicita a těkavost rozpouštědla a rozpustnost zkoušené látky ve zvoleném rozpouštědle.

24. Pro chemické látky, které jsou obtížně rozpustné ve vodě a v organických rozpouštědlech, lze smísit 2,0–2,5 g jemně rozemletého křemenného písku na zkušební nádobu, např. pomocí třecí misky a tloučku s takovým množstvím zkoušené látky, aby bylo dosaženo požadované zkušební koncentrace. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do navlhčené půdy a důkladně se promíchá s příslušným množstvím deionizované vody, aby bylo dosaženo požadované vlhkosti. Konečná směs se rozdělí do zkušebních nádob. Tento postup se opakuje pro každou zkušební koncentraci a připraví se také příslušná kontrola s 2,0–2,5 g jemně rozemletého křemenného písku na zkušební nádobu.

25. Po vmíchání by měla být stanovena koncentrace zkoušené látky v půdě. Před vložením zkušebních organismů je třeba ověřit homogenní distribuci zkoušené chemické látky v půdě. Měla by být uvedena metoda vmíchání a důvody pro výběr konkrétní metody vmíchání (24).

26. Rovnováha mezi půdou a fází kapilární vody by měla být v ideálním případě nastolena před přidáním organismů; doporučuje se doba čtyř dnů při teplotě 20 °C. Pro řadu organických chemických látek těžko rozpustných ve vodě se doba potřebná k dosažení skutečné rovnováhy mezi adsorbovanou a rozpuštěnou frakcí počítá ve dnech nebo v měsících. V závislosti na účelu studie, například když je potřeba napodobit podmínky okolního prostředí, může obohacená půda „zrát“ i déle, například u kovů po dobu tří týdnů při teplotě 20 °C (22).

Kultivace zkušebních organismů

27. Červi by měli být v optimálním případě nepřetržitě udržováni v laboratorních podmínkách. Pokyny týkající se metod laboratorní kultury pro *Eisenia fetida*, *Eisenia Andrei* a roupice jsou uvedeny v příloze 5 (viz také (48, 51, 52)).

28. Červi použití při zkouškách nesmí vykazovat pozorovatelné nemoci, abnormality a parazity.

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

29. Zkušební organismy se exponují zkoušené látce během fáze příjmu. Fáze příjmu by měla trvat 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), pokud není prokázáno, že bylo dosaženo ustáleného stavu.

▼M4

30. Ve fázi vylučování se červi přenesou do půdy bez zkoušené látky. První vzorek by měl být odebrán 4–24 hodin po zahájení fáze vylučování. Příklady harmonogramů odběru vzorků pro jedenadvacetidenní fázi příjmu a jedenadvacetidenní fázi vylučování jsou uvedeny v dodatku 3.

Zkušební organismy

31. Řada druhů terestrických roupic má jen velmi nízkou individuální hmotnost (např. 5–10 mg hmotnosti ve vlhkém stavu na jedince u *Enchytraeus albidus* a ještě méně u *Enchytraeus crypticus* či *Enchytraeus luxuriosus*); aby bylo možné provést vážení a chemickou analýzu, může být nezbytné sdružovat červy v paralelních zkušebních nádobách (tj. k získání jednoho analytického výsledku tkáně se použijí všichni červi v paralelní nádobě). Do každé paralelní nádoby se vloží 20 jednotlivých roupic a použijí se nejméně tři paralelní nádoby. V případě, že jsou meze stanovitelnosti zkoušené látky příliš vysoké, může být potřeba více červů. U zkušebních druhů s vyšší individuální hmotnosti (*Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei*) lze použít paralelní nádoby obsahující pouze jednoho jedince.

32. Žížaly použité ke zkoušce by měly mít podobnou hmotnost (např. *Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei* by měly mít individuální hmotnost 250–600 mg). Roupice např. *Enchytraeus albidus*) by měly být přibližně 1 cm dlouhé. Všichni červi užití pro konkrétní zkoušku musí pocházet ze stejného zdroje a mělo by se jednat o dospělé jedince s opaskem (viz příloha 5). Vzhledem k tomu, že hmotnost a stáří živočicha může mít vliv na hodnoty BAF (např. z důvodu různého obsahu lipidů a/nebo přítomnosti vajíček), měly by být tyto parametry přesně zaznamenány a zohledněny při interpretaci výsledků. Kromě toho mohou být v průběhu doby expozice vyprodukovány kokony, což rovněž ovlivní hodnoty BAF. Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek zkoušených červů s cílem odhadnout střední hmotnost ve vlhkém a v suchém stavu.

33. Volí se vysoký poměr množství půdy k počtu červů, aby se minimalizovalo snížení koncentrace zkoušené chemické látky v půdě v průběhu fáze příjmu. V případě *Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei* se doporučuje minimální množství 50 g suché hmotnosti (d.w.) půdy na jednoho červa a v případě roupic minimálně 10–20 g suché hmotnosti půdy na zkušební nádobu. Nádoby by měly obsahovat vrstvu půdy o tloušťce 2–3 cm (roupice) nebo 4–5 cm (žížaly).

34. Červi použití ke zkoušce se vyjmou z kultury (např. roupice pomocí klenotnické pinzety). Dospělí jedinci se přenesou na neexponovanou zkušební půdu za účelem aklimatizace a krmí se (viz odstavec 36). V případě, že se zkušební podmínky liší od kultivačních podmínek, měla by pro přizpůsobení červů zkušebním podmínkám postačovat aklimatizační fáze v trvání 24 až 72 hodin. Po aklimatizaci se žížaly omyjí přenesením do skleněných misek (např. Petriho misek), které obsahují čistou vodu, a následně se před přidáním do zkušební půdy zváží. Před zvážením se z červů odstraní přebytečná voda jemným oklepáním o okraj misky nebo opatrným osušením do sucha pomocí lehce navlhčeného papírového ručníku.

35. Zavrtávání zkušebních organismů by mělo být sledováno a zaznamenáváno. Při zkouškách s žížalami se jedinci (v kontrolních i exponovaných nádobách), běžně zavrtají do půdy do několika hodin; tuto skutečnost je nutno zkontrolovat nejpozději do 24 hodin po vložení červů do zkušebních nádob. V případě, že se žížaly nezavrtají do půdy (např. více než 10 % v době přesahující polovinu fáze příjmu), znamená to, že buď nejsou vytvořeny vhodné zkušební podmínky, nebo zkušební organismy nejsou zdravé.

▼M4

V takovém případě je nutno zkoušku ukončit a opakovat. Roupice žijí hlavně v intersticiálních pórech v půdě a jejich integument je často v kontaktu s okolním substrátem jen částečně; expozice zavrtávajících se a nezavrtávajících se roupic se považuje za rovnocennou a nezavrtávání roupic nemusí nutně vyžadovat opakování zkoušky.

Krmení

36. Krmení by se mělo předpokládat při použití půdy s nízkým celkovým obsahem organického uhlíku. Při použití umělé půdy se doporučuje týdenní frekvence krmení (tj. červi by měli být krmeni jednou týdně) 7 mg sušeného hnoje na gram suché hmotnosti půdy pro žížaly a týdenní frekvence 2–2,5 mg mletých ovesných vloček na gram suché hmotnosti půdy pro roupice (11). První krmná dávka se smíchá s půdou bezprostředně před přidáním zkušebních organismů. Optimálně by měl být užíván stejný typ krmiva jako v kulturách (viz dodatek 5).

Světlo a teplota

37. Zkouška se provede za řízených světelných podmínek v prostorách, kde jsou umístěny zkušební nádoby, nejlépe 16 h světlo / 8 h tma, optimálně při intenzitě osvětlení 400 lux až 800 lux (3). Zkušební teplota by se měla udržovat na 20 ± 2 °C po celou dobu zkoušky.

Zkušební koncentrace

38. Použije se jedna koncentrace. Situace, kdy je vyžadována (jsou vyžadovány) další koncentrace, by měly být zdůvodněny. Pokud se toxicita (EC_x) zkoušené chemické látky blíží mezi detekce analytické metody, doporučuje se užití zkoušené látky značené radioizotopy s vysokou specifickou radioaktivitou. Pro kovy by její koncentrace měla být vyšší než koncentrace v pozadí ve tkáních a v půdě.

Paralelní vzorky

39. Pro kinetická měření (ve fázi příjmu a vylučování) je minimální počet exponovaných paralelních nádob tři na jeden odběr. Celkový počet připravených paralelních nádob by měl být dostatečný k pokrytí všech odběrů ve fázi příjmu i vylučování.

40. Pro biologická pozorování a měření (např. poměr hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti, obsah lipidů) a pro analýzu koncentrací v pozadí v červech a půdě je zapotřebí nejméně 12 paralelních nádob negativních kontrol (čtyři vzorky odebrané na začátku a čtyři na konci fáze příjmu a čtyři na konci fáze vylučování) v případě, že není použito jiné rozpouštědlo než voda. Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky užito jakékoli solubilizační činidlo, měly by být kromě exponovaných paralelních nádob připraveny i kontroly rozpouštědla (ze čtyř paralelních nádob by měly být odebrány vzorky na začátku, ze čtyř na konci fáze příjmu a ze čtyř na konci fáze vylučování), které budou obsahovat všechny složky s výjimkou zkoušené látky. V tomto případě je možno použít další čtyři paralelní nádoby jako negativní kontroly (bez rozpouštědla) za účelem volitelného odběru vzorků na konci fáze příjmu. Tyto paralelní nádoby lze biologicky srovnat s kontrolou rozpouštědla s cílem získat informace o možném vlivu rozpouštědla na zkušební organismy. Doporučuje se použít dostatečný počet dalších rezervních paralelních nádob (např. osm) pro expozici a kontrolu.

▼M4

Četnost měření kvality půdy

41. Na počátku a na konci fáze příjmu a fáze vyprázdnění se změří pH půdy, vlhkost půdy a teplota (kontinuálně) ve zkušební místnosti. Jednou týdně by se měla kontrolovat vlhkost půdy zvážením zkušebních nádob a porovnáním jejich skutečné hmotnosti s počáteční hmotností na začátku zkoušky. Ztráty vody by měly být kompenzovány přidáním deionizované vody.

Odběr vzorků a analýza červů a půdy

42. Příklad harmonogramu fází příjmu a vylučování u bioakumulačních zkoušek na žížalách a roupicích je uveden v dodatku 3.

43. Vzorky půdy ze zkušebních nádob pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky se odebírají před vložením červů, během fáze příjmu a během fáze vylučování. Během zkoušky se stanoví koncentrace zkoušené chemické látky v červech a v půdě. Obecně platí, že se měří celkové koncentrace v půdě. Nepovinně lze měřit koncentrace v kapilární vodě, a v takovém případě je před zahájením studie nutno uvést zdůvodnění a vhodné metody, které jsou zahrnuty také do zprávy.

44. Vzorky z červů a půdy se odebírají nejméně šestkrát během fáze příjmu a fáze vylučování. V případě, že se prokáže stabilita zkoušené chemické látky, lze počet analýz půdy snížit. Doporučuje se analyzovat nejméně tři paralelní vzorky na začátku a na konci fáze příjmu. V případě, že se koncentrace v půdě měřená na konci fáze příjmu liší od počáteční koncentrace o více než 30 %, měly by být analyzovány i vzorky půdy odebrané v jiných termínech.

45. Červi v dané paralelní nádobě se vyjmou z půdy při každém odběru (např. rozprostřením půdy z paralelní nádoby na mělkou podložku a vyjmutím červů pomocí měkké klenotnické pinzety) a rychle se opláchnou vodou na mělké skleněné nebo ocelové podložce. Odstraní se přebytečná voda (viz bod 34). Červi se opatrně přenesou do předem zvážené nádoby a okamžitě se zváží, včetně střevního obsahu.

46. Žížalám (*Eisenia* sp.) by pak mělo být umožněno přes noc vyprázdnit střeva např. na vlhkém filtračním papíru v přikryté Petriho misce (viz bod 34). Po vyprázdnění by měla být stanovena hmotnost červů za účelem posouzení možného úbytku biomasy během zkoušky (viz kritéria platnosti v bodě 17). Vážení a analýza tkání u roupic se provádí bez vyprázdnění, které by bylo technicky obtížné vzhledem k malé velikosti těchto červů. Po konečném určení hmotnosti by měli být červi okamžitě usmrceni nejvhodnější metodou (např. pomocí tekutého dusíku nebo zmrazením při teplotách pod –18 °C).

47. V průběhu fáze vylučování nahradí červi kontaminovaný střevní obsah čistou zeminou. To znamená, že měření u nevyprázdněných červů (v tomto kontextu roupic), kde byly odebrány vzorky bezprostředně před fází vylučování, obsahují kontaminovanou půdu ze střeva. U vodních máloštětinatců se předpokládá, že po počátečních 4–24 hodinách vylučovací fáze je již většina kontaminovaného obsahu střeva nahrazena čistým sedimentem, např. (46). Obdobné výsledky jsou uváděny u žížal v případě studií o hromadění radioaktivně značeného kadmia a zinku (78). U nevyprázdněných roupic lze koncentraci tohoto prvního vzorku vylučovací fáze považovat za koncentraci v tkáni po vyprázdnění střeva. Pro zohlednění naředění koncentrace zkoušené látky nekontaminovanou půdou v průběhu fáze vylučování lze odhadnout hmotnost střevního obsahu z poměru hmotnosti červa ve vlhkém stavu a hmotnosti popela po spálení červa, případně z poměru suché hmotnosti červa a hmotnosti popela po spálení červa.

▼M4

48. Vzorky půdy a červů se pokud možno analyzují ihned po vyjmutí (tj. do 1–2 dnů) s cílem předejít rozkladu nebo jiným ztrátám a výpočet přibližné rychlosti příjmu a vylučování se doporučuje provést ještě v průběhu zkoušky. Neprovede-li se analýza okamžitě, vzorky se vhodným způsobem uchovají, např. hlubokým zmrazením (≤ –18 °C).

49. Je třeba zkontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z půdy, tak ze vzorků červů jsou pro danou analytickou metodu dostatečné; uvádí se rovněž účinnost extrakce, mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ). Stejně tak je třeba zkontrolovat, zda se zkoušená chemická látka nevyskytuje v kontrolních nádobách v koncentracích vyšších než koncentrace v pozadí. Pokud je koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebním organismu u kontrolní skupiny červů Ca > 0, měla by být zahrnuta do výpočtu kinetických parametrů (viz dodatek 2). Všechny vzorky by měly být v průběhu celé zkoušky zpracovávány tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce zkoušené chemické látky odběrným zařízením).

50. Jsou-li použity zkušební chemické látky značené radioizotopy, je možné provést analýzu pro výchozí látku i s metabolity. Kvantifikace výchozí zkušební chemické látky a metabolitů v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu poskytuje důležité informace. Následně by měla být provedena separace, aby mohla být výchozí látka analyzována samostatně. Pokud obsah radioaktivity v jednotlivých metabolitech přesáhne 10 % celkové radioaktivity v analyzovaném vzorku (vzorcích), doporučuje se stanovit i tyto metabolity.

51. Měl by být zaznamenán a hlášen celkový vývin a vývin zkoušené látky v červech, v půdě a případně i v lapačích obsahujících absorbenty k zachycení odpařené zkoušené chemické látky.

52. U roupic, které jsou menší než žížaly, je přijatelné sdružování jedinců odebraných jako vzorek z dané zkušební nádoby. Pokud sdružování znamená redukci počtu paralelních nádob, omezuje to statistické postupy, které lze na údaje aplikovat. Pokud je vyžadován určitý statistický postup a statistická váha, měl by být ve zkoušce nasazen přiměřený počet paralelních zkušebních nádob vyhovující požadovanému sdružování, postupu a statistické váze.

53. Doporučuje se, aby byla hodnota BAF vyjádřena jako funkce celkové suché hmotnosti, a bude-li to vyžadováno (např. u vysoce hydrofobních chemických látek), také jako funkce obsahu lipidů. Pro stanovení obsahu lipidů by měla být použita vhodná metoda (pro tento účel by měly být přizpůsobeny některé již existující metody – např. (31), (58). yto metody využívají extrakci pomocí chloroformu/methanolu. Aby se zabránilo používání chlorovaných rozpouštědel, měla by však být použita modifikace Bligh/Dyerovy metody (9) uvedené v odstavci (17). Vzhledem k tomu, že různé metody nemusí poskytovat stejné hodnoty (10), je důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, tj. pokud je k dispozici dostatečné množství tkáně červů, měla by být analýza lipidů provedena optimálně na stejném vzorku extraktu, který byl užit pro analýzu zkoušené chemické látky, neboť lipidy musí být často z extraktu před chromatografickou analýzou odstraněny. Pro stanovení obsahu lipidů lze použít rovněž kontrolní živočichy a tento obsah lze pak použít k normalizaci hodnot BAF. Tento druhý postup snižuje kontaminaci zařízení zkoušenou chemickou látkou.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

54. Křivka příjmu zkoušené látky se sestrojí vynesením její koncentrace v červech nebo na nich v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka fáze plató čili ustáleného stavu (viz definice v dodatku 1), vypočítá se hodnota bioakumulačního faktoru v ustáleném stavu BAF_{SS} z poměru:

$$\frac{C_a \text{ v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu (střední hodnota)}}{C_s \text{ v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu (střední hodnota)}}$$

C_a je koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebním organismu,

C_s je koncentrace zkoušené chemické látky v půdě.

55. Není-li dosaženo ustáleného stavu, měla by být místo hodnoty BAF_{SS} vypočtena hodnota BAF_K na základě rychlostních konstant, jak je popsáno níže:

— Stanoví se akumulační faktor (BAF_K) jako poměr k_s/k_e.

— Rychlost příjmu a vylučování se optimálně vypočtou současně (viz rovnice 11 v dodatku 2).

— Rychlostní konstanta vylučování (k_e) se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v červech v průběhu fáze vylučování). Následně se vypočte rychlostní konstanta příjmu pomocí hodnoty k_e a hodnoty C_a, odvozené z křivky příjmu (popis těchto metod viz dodatek 2). Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty BAF_K a rychlostních konstant k_s a k_e je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely.

Protokol o zkoušce

56. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— veškeré dostupné informace o akutní nebo dlouhodobé toxicitě (např. EC_x, LC_x“ NOEC) zkoušené chemické látky pro půdní máloštětinatce,

— čistotu, fyzikální povahu a fyzikálně-chemické vlastnosti, např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě,

— chemické identifikační údaje; zdroj zkoušené položky, identifikaci a koncentraci případného použitého rozpouštědla,

— v případě značení radioaktivními izotopy jejich přesnou polohu, specifickou radioaktivitu a radiochemickou čistotu.

Testovací druh:

— vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, rozmezí velikostí atd.

▼M4

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup,

— typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádob, hmotnost půdy a tloušťka půdní vrstvy, počet paralelních nádob, počet červů v jedné paralelní nádobě, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků),

— zdůvodnění výběru materiálu zkušební nádoby,

— metoda přípravy a aplikace zkoušené položky a důvody pro výběr konkrétní metody,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách, jejich směrodatné odchylky a metody, jimiž byly tyto hodnoty získány,

— zdroj složek umělé půdy nebo – v případě užití přírodního média – původ půdy, popis jakékoli předchozí úpravy, výsledky kontrol (přežití, vývoj biomasy, reprodukce), charakteristika půdy, (pH, obsah celkového organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu), procento obsahu vody WHC_{max} na začátku a na konci zkoušky a jiná provedená měření),

— podrobné informace o expozici vzorků půdy a červů včetně podrobností o přípravě, uchovávání, postupech vmíchávání, extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku v červech a půdě, obsah lipidů (je-li měřen) a výtěžky zkoušené položky.

Výsledky:

— úhyn kontrolních červů a červů v každé zkušební nádobě a jakékoli pozorované neobvyklé chování (např. snaha uniknout z půdy, nerozmnožování v bioakumulačních zkouškách na roupicích),

— poměr suché hmotnosti půdy a zkušebních organismů k jejich hmotnosti ve vlhkém stavu (užitečné pro normalizaci),

— hmotnost červů ve vlhkém stavu při každém odběru; u žížal vlhká hmotnost na začátku zkoušky a po každém odběru před pročištěním střev a po něm,

— obsah lipidů ve zkoušených organismech (je-li stanoven),

— křivky kinetiky příjmu a vylučování zkoušené chemické látky červy a doba dosažení ustáleného stavu,

— hodnoty C_a a C_s (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota C_a se vyjadřuje v g/kg vlhké a suché hmotnosti celého těla, hodnota C_s se vyjadřuje v g/kg vlhké a suché hmotnosti půdy). Pokud je vyžadován akumulační faktor biota-půda (BSAF) (například pro porovnání výsledků dvou nebo více zkoušek provedených s živočichy s odlišným obsahem lipidů), lze navíc vyjádřit i hodnotu C_a jako g/kg obsahu lipidů v organismu a hodnotu C_s jako g/kg organického uhlíku (OC) v půdě.

— dodatečně lze uvést i BAF (vyjádřený v kg půdy na·kg červů), rychlostní konstantu příjmu půdy k_s (vyjádřenou v g půdy na kg červů za den) a rychlostní konstantu vylučování k_e (vyjádřenou v číselné hodnotě za den); BSAF (vyjádřený v kg organického půdního uhlíku na kg obsahu lipidů v červech),

▼M4

— měří-li se, procentuální podíl výchozí chemické látky, metabolitů a vázaných reziduí (tj. procentní podíl zkoušené chemické látky, který nelze extrahovat běžnými metodami extrakce) zjištěný v půdě a ve zkoušených živočiších,

— metody užívané pro statistické analýzy dat.

Vyhodnocení výsledků

— soulad výsledků s kritérii validity uvedenými v odstavci 17,

— neočekávané nebo neobvyklé výsledky, např. neúplné odstranění zkoušené látky z pokusných zvířat.

LITERATURA:

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES, Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Ke stažení na adrese: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Kapitola C.8 této přílohy - Toxicita pro žížaly.

49) Kapitola C.13 této přílohy - Bioakumulace: průtoková zkouška na rybách.

50) Kapitola C.21 této přílohy - Půdní mikroorganismy: zkouška na transformaci dusíku.

51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt, 1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICE

Bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v okolním médiu. Bioakumulace je výsledkem biokoncentračních a bioobohacovacích procesů (viz níže).

Biokoncentrace je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm příjmem zkoušené chemické látky výhradně z okolního média (tj. povrchem těla a ingescí půdy) vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v okolním médiu.

Bioobohacování je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm hlavně příjmem kontaminované potravy nebo kořisti vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v této potravě nebo kořisti. Bioobohacování může vést k přestupu nebo akumulaci zkoušené látky v potravních řetězcích.

Vylučování zkoušené chemické látky je úbytek této chemické látky z tkáně zkoušeného organismu na základě aktivních nebo pasivních procesů, ke kterému dochází nezávisle na přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoušené položky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BAF) je koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm (C_a v g/kg suché hmotnosti červů) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_s jako g/kg suché hmotnosti půdy), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této bioakumulační zkoušce. Jednotkou BAF je kg půdy·na kg červů.

Bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BAF_{SS}) je BAF v ustáleném stavu a po dlouhou dobu se výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu (C_s jako g/kg suché hmotnosti půdy) je po tuto dobu konstantní.

Biokoncentrační faktory vypočtené přímo z poměru rychlostní konstanty příjmu z půdy a rychlostní konstanty vylučování (k_s a k_e, viz níže) se nazývají kinetický bioakumulační faktor (BAF_K).

Akumulační faktor biota-půda (BSAF) je koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm normalizovaná na lipidy, dělená koncentrací zkoušené látky v půdě v ustáleném stavu normalizované na organický uhlík. C_a se pak vyjádří jako g/kg obsahu lipidů v organismu a C_s jako g/kg obsahu organických látek v půdě; jednotkami BSAF jsou kg OC na·kg lipidů.

Plató nebo **ustálený stav** je definován jako rovnováha mezi procesem příjmu a vylučování, k němuž dochází při fázi expozice současně. Ustáleného stavu je dosaženo tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti BAF rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy BAF vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o ±20 % a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný statisticky významný rozdíl. V případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly (49).

Rozdělovací koeficient organický uhlík/voda (K_{oc}) je rovnovážný poměr mezi koncentrací chemické látky ve/na frakci organického uhlíku v půdě a koncentrace chemické látky ve vodě.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemické látky v n-oktanolu a ve vodě (někdy se označuje také jako $P_{ow)}$. Logaritmus hodnoty K_{ow} (log K_{ow}) se používá jako ukazatel potenciálu chemikálie bioakumulovat se ve vodních organismech.

▼M4

Expozice nebo fáze příjmu je časový úsek, během něhož jsou zkoušené organismy vystaveny působení zkoušené chemické látky.

Rychlostní konstanta příjmu z půdy (k_s) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené položky ve zkoušených organismech nebo na nich v důsledku příjmu z půdní fáze. k_s se vyjadřuje v g půdy na kg červů za den.

Vylučovací fáze je časový úsek po přemístění zkušebních organismů z kontaminovaného média do média, které zkoušenou látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování chemické látky ze zkušebních organismů (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_e) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm po přemístění zkoušených organismů z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které neobsahuje chemické látky; k_e je vyjádřeno jako číselná hodnota za den.

Zkoušená chemická látka: jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 2

Výpočet parametrů příjmu a vylučování

Hlavním koncovým bodem bioakumulační zkoušky je bioakumulační faktor BAF. Měřený BAF lze vypočítat tak, že se koncentrace ve zkušebním organismu C_a, vydělí koncentrací v půdě C_s v ustáleném stavu. Pokud není ustáleného stavu dosaženo během fáze příjmu, vypočte se BAF_K z rychlostních konstant místo BAF_{SS}. Je však třeba zaznamenat, zda je BAF založen na koncentracích v ustáleném stavu či nikoli.

Obvyklou metodou pro získání hodnoty kinetického bioakumulačního faktoru (BAF_K), rychlostní konstanty příjmu (k_s) a rychlostní konstanty vylučování (k_e) jsou metody nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače, např. na základě modelů popsaných v odstavci (68). Na základě souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích a modelových rovnic:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 1]}$$

nebo

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 2]}$$

kde:

C_a = koncentrace chemické látky v červech [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_s = rychlostní konstanta příjmu v tkáni [g půdy na kg červů za den],

C_s = koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_e = rychlostní konstanta vylučování [1/d],

t_c = čas konce fáze příjmu.

Tyto počítačové programy vypočtou hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

V případě, že se koncentrace neexponovaných červů například v den 0 významně liší od nuly (k tomu může dojít například v případě kovů), měla by být tato koncentrace v pozadí ($C_{a,0}$) zahrnuta do uvedených rovnic takto:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 3]}$$

a

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 4]}$$

V případech, kdy dojde v průběhu času během fáze příjmu k významnému poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v půdě lze použít následující modely, např. (67, 79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[rovnice 5]}$$

▼M4

kde:

C_s = koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_0 = rychlostní konstanta rozkladu v půdě [1/d],

C_0 = počáteční koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti].

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 7]}$$

kde:

C_a = koncentrace chemické látky v červech [g na kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_s = rychlostní konstanta příjmu v tkáni [g půdy na kg červů za den],

k_0 = rychlostní konstanta rozkladu v půdě [1/d],

k_e = rychlostní konstanta vylučování [1/d],

t_c = čas konce fáze příjmu.

Když je během fáze příjmu dosaženo ustáleného stavu (tj. $t = \infty$), rovnice 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 1]}$$

může být zjednodušena na rovnici:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

nebo

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[rovnice 8]}$$

Pak k_s/k_e x C_s je přiblížením ke koncentraci zkoušené látky ve tkáni červů v ustáleném stavu ($C_{a,ss}$).

Akumulační faktor biota-půda (BSAF) lze vypočítat následovně:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[rovnice 9]}$$

kde f_{oc} je frakcí organického uhlíku v půdě a f_{lip} je frakcí lipidů v červech, obojí v optimálním případě stanoveno na vzorcích odebraných při zkoušce buď na základě hmotnosti po vysušení (f_{oc}) nebo živé váhy (f_{lip}).

Kinetiku vylučování lze modelovat pomocí dat z fáze vylučování za použití níže uvedené modelové rovnice a metody nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Pokud data vynesená do grafu proti času indikují konstantní exponenciální pokles koncentrace zkoušené látky u zvířat, lze použít k popisu časového průběhu vylučování model s jedním kompartmentem (rovnice 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[rovnice 10]}$$

▼**M4**

Procesy vylučování se někdy jeví jako dvoufázové, neboť vykazují rychlý pokles C_a během raných fází, který se v pozdějších fázích vylučování změní na pomalejší úbytek zkoušených látek, např. (27) (68). Tyto dvě fáze mohou být interpretovány na základě předpokladu, že v organismu existují dva různé kompartmenty, z nichž dochází k úbytku zkoušené látky odlišnou rychlostí. V těchto případech je nutno studovat specifickou literaturu, např. (38, 39, 40, 78).

Pomocí výše uvedených modelových rovnic lze rovněž zároveň vypočítat kinetické parametry (k_s a k_e) uplatněním modelu kinetiky prvního řádu na všechna data z fáze příjmu a z fáze vylučování současně. Popis metody, která by mohla umožnit takovýto kombinovaný výpočet rychlostních konstant příjmu a vylučování, lze nalézt v odkazech (41, 73 a 70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[rovnice 11]}$$

Poznámka: Pokud se parametry příjmu a vylučování odhadují současně z kombinovaných dat o příjmu a vylučování, je hodnota „m“ uvedená v rovnici 11 deskriptorem, který umožňuje počítačovému programu přiřadit dílčí členy rovnice datovým sadám příslušné fáze a provést správné vyhodnocení (m = 1 pro fázi příjmu, m = 2 pro fázi vylučování).

Tyto modelové rovnice je však nutno užívat obezřetně, zvláště v případě změn biologické dostupnosti zkoušené chemické látky nebo (bio) rozkladu, k nimž dojde během zkoušky (viz např. (79)).

▼**M4**

Dodatek 3

PŘÍKLADY HARMONOGRAMŮ ZKOUŠEK BIOAKUMULACE V PŮDĚ

Zkouška na žížalách

a) Fáze příjmu s 8 daty odběrů vzorků užitými pro výpočet kinetiky

Den	Činnost
– 6	kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	vmíchání roztoku zkoušené chemické látky do půdní frakce, odpaření případného rozpouštědla, promísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, ustavování rovnováhy při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů (3 týdny u půdy obohacené kovem)
– 3 až – 1	oddělení zkušebních organismů z kultury za účelem aklimatizace; příprava a zvlhčení půdních složek,
0	měření teploty a pH půdy, odstraňování vzorků půdy ze zkušebních nádob a kontrola rozpouštědel pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky, doplnění krmné dávky, zvážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, zachování dostatečných dílčích vzorků červů pro stanovení analytických hodnot pozadí, hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti a obsahu lipidů, zvážení všech zkušebních nádob za účelem kontroly vlhkosti půdy, kontrola přívodu vzduchu, pokud je užit uzavřený zkušební systém
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené položky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
8–9	stejný jako 3. den
10	stejný jako 1. den
11–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
15–16	stejný jako 3. den
17	stejný jako 1. den
18–20	stejný jako 3. den

▼**M4**

Den	Činnost
21	stejný jako 1 den; měření teploty a pH půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob, ukončení fáze příjmu, přenesení červů ze zbývajících exponovaných paralelních nádob do nádob obsahujících čistou půdu pro fázi eliminace (bez vyprázdnění střev), odběr vzorků půdy a červů z rozpouštědlové kontroly
	adaptační činnosti (fáze ustavování rovnováhy) by měly být naplánovány s ohledem na vlastnosti zkoušené chemické látky
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny).

b) Fáze vylučování

Den	Činnost
– 6	příprava a zvlhčení půdních složek, kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	smísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, inkubace při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů
0 (konec fáze příjmu)	měření teploty a pH půdy, vážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, doplnění krmné dávky, přemístění červů ze zbývajících exponovaných paralelních vzorků do nádob obsahujících čistou půdu, odebrání vzorků půdy a červů po 4–6 hodinách za účelem stanovení koncentrace zkoušené chemické látky
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené chemické látky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
8–9	stejný jako 3. den
10	stejný jako 1. den
11–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
15–16	stejný jako 3. den
17	stejný jako 1. den

▼M4

Den	Činnost
18–20	stejný jako 3. den
21	stejný jako 1. den; měření teploty a pH půdy; kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob; odběr vzorků půdy a červů z kontrol rozpouštědla
	příprava půdy před zahájením fáze vylučování by měla být provedena stejným způsobem jako před fází příjmu.
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

Zkouška na roupicích

a) Fáze příjmu s 8 daty odběrů vzorků užitými pro výpočet kinetiky

Den	Činnost
– 6	kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	vmíchání roztoku zkoušené chemické látky do půdní frakce, odpaření případného rozpouštědla, promísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, ustavování rovnováhy při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů (3 týdny u půdy obohacené kovem)
– 3 až – 1	oddělení zkušebních organismů z kultury za účelem aklimatizace; příprava a zvlhčení půdních složek
0	měření teploty a pH půdy, odstraňování vzorků půdy ze zkušebních nádob a kontrola rozpouštědel pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky, doplnění krmné dávky do půdy, zvážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, zachování dostatečných dílčích vzorků červů pro stanovení analytických hodnot pozadí, hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti a obsahu lipidů, zvážení všech zkušebních nádob za účelem kontroly vlhkosti půdy, kontrola přívodu vzduchu, pokud je užit uzavřený zkušební systém
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené položky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky do půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
9	stejný jako 1. den
10	stejný jako 3. den

▼**M4**

Den	Činnost
11	stejný jako 1. den
12–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky do půdy, měření teploty a pH půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob, ukončení fáze příjmu, přenesení červů ze zbývajících exponovaných paralelních nádob do nádob obsahujících čistou půdu pro fázi vylučování (bez vyprázdnění střev), odběr vzorků půdy a červů z rozpouštědlové kontroly
	adaptační činnosti (fáze ustavování rovnováhy) by měly být naplánovány s ohledem na vlastnosti zkoušené chemické látky
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

▼M4

Dodatek 4

Umělá půda – doporučení pro přípravu a skladování

Vzhledem k tomu, že přírodní půda z určitého zdroje nemusí být k dispozici po celý rok a zkoušku mohou ovlivnit původní organismy i přítomnost mikroskopických znečišťujících látek, doporučuje se použít při této zkoušce umělý substrát, umělou půdu podle kapitoly C.8 této přílohy – Toxicita pro žížaly (48). V této půdě může přežít, růst a rozmnožovat se více zkušebních testovacích druhů a je zajištěna maximální standardizace i zkušební a kultivační podmínky srovnatelné vnitrolaboratorně i mezilaboratorně.

Složky půdy

Rašelina:	10 %	Sfagnová rašelina v souladu se směrnicí OECD č. 207 (48);
Křemenný písek:	70 %	Průmyslový křemenný písek (vysušený na vzduchu); velikost částic: více než 50 % částic by se měla pohybovat v rozpětí 50–200 μm, ale všechny částice by měly být ≤ 2 mm
Kaolinitický jíl	20 %	Obsah kaolinitu ≥ 30 %
Uhličitan vápenatý	≤ 1 %	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý

Obsah organického uhlíku v umělé půdě lze podle potřeby snížit například snížením obsahu rašeliny na 4–5 % suché půdy a odpovídajícím zvýšením obsahu písku. Takovým snížením obsahu organického uhlíku se může snížit schopnost adsorpce zkoušené chemické látky (organický uhlík), do půdy a dostupnost zkoušené chemické látky pro červy se může zvýšit (74). Bylo prokázáno, že *Enchytraeus albidus* a *Eisenia fetida* mohou splnit kritéria validity pro reprodukci při testování v polních půdách s nižším obsahem organického uhlíku, např. 2,7 % (33), (61), a dle zkušenosti toho lze dosáhnout i v umělé půdě s 5 % obsahem rašeliny.

Příprava

Suché složky půdy se důkladně promísí (např. ve velké laboratorní míchačce). To by mělo být provedeno přibližně týden před zahájením zkoušky. Smíchané suché složky půdy by se měly navlhčit deionizovanou vodou minimálně 48 hodin před aplikací zkoušené chemické látky, aby se vyrovnala/stabilizovala kyselost. Hodnota pH se měří po smíchání půdy s roztokem 1M KCl v poměru 1:5. Pokud není hodnota pH v požadovaném rozsahu (6,0 ± 0,5), musí se do půdy přidat dostatečné množství $CaCO_3$ nebo se musí připravit nová šarže půdy.

Maximální vodní kapacita (WHC) v umělé půdě se stanoví v souladu s normou ISO 11268-2 (35). Nejméně dva dny před započetím zkoušky se suchá umělá půda zvlhčí přídavkem dostatečného množství deionizované nebo rekonstituované vody, aby bylo dosaženo přibližně poloviny výsledného obsahu vody. Výsledný obsah vody by se měl rovnat 40 % až 60 % maximální vodní kapacity. Na začátku zkoušky se navlhčená půda rozdělí do tolika dávek, kolik je zkušebních koncentrací a kontrol při zkoušce, a obsah vlhkosti se upraví na 40–60 % WHC_{max} pomocí roztoku zkoušené chemické látky a/nebo přidáním deionizované nebo rekonstituované vody. Obsah vlhkosti se stanoví na začátku a na konci zkoušky (při 105 °C). Měl by optimálně vyhovovat potřebám jednotlivých druhů (obsah vlhkosti lze rovněž ověřit lehkým stlačením rukou a mezi prsty by se měly objevit pouze malé kapičky vody).

▼M4

Uchovávání

Suché složky umělé půdy mohou být uchovávány při pokojové teplotě až do použití. Připravenou předvlhčenou půdu lze skladovat v chladu po dobu až tří dnů před vmícháním; je třeba dbát na minimalizaci odpařování vody. Půda obohacená zkoušenou látkou by měla být použita bezprostředně, pokud nejsou k dispozici informace o tom, že tuto určitou půdu lze skladovat bez vlivu na toxicitu a biologickou dostupnost zkoušené chemické látky. Vzorky obohacené půdy pak mohou být uchovány za podmínek doporučených pro konkrétní zkoušenou látku až do provedení analýzy.

▼M4

Dodatek 5

Druhy terestrických máloštětinatců doporučené pro zkoušky bioakumulace z půdy

Žížaly

Doporučeným zkušebním druhem je *Eisenia fetida* (Savigny 1826), patřící do čeledi Lumbricidae. Od roku 1972 je rozdělen do dvou poddruhů (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (10)). Podle Jaenikeho (36) se jedná o samostatné oddělené druhy. *Eisenia fetida* je snadno rozpoznatelná podle jasně žlutých pruhů na článcích, zatímco *Eisenia andrei* má jednolitou tmavě červenou barvu. Oba druhy pravděpodobně pocházejí z černomořské oblasti a dnes jsou rozšířeny po celém světě, zejména v antropogenně modifikovaných přírodních stanovištích, jako jsou hromady kompostu. Oba tyto druhy lze použít pro ekotoxikologické zkoušky i pro zkoušky bioakumulace.

Eisenia fetida a *Eisenia andrei* jsou komerčně dostupné, např. jako rybí návnada Ve srovnání s jinými druhy z čeledi žížalovitých mají krátký životní cyklus, dosahují dospělosti za přibližně 2–3 měsíce (při pokojové teplotě). Jejich optimální teplota je přibližně 20 až 24 °C. Dávají přednost relativně vlhkým substrátům s téměř neutrálním pH a vysokým obsahem organických látek. Vzhledem k široce rozšířenému využívání těchto druhů ve standardizovaných ekotoxikologických zkouškách po dobu již asi 25 let je jejich kultivace dobře zavedena (48, 77).

Oba druhy lze chovat v celé řadě zvířecích exkrementů. Chovné médium, které doporučuje ISO (35) je 50:50 směs koňského nebo hovězího hnoje a rašeliny. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mS/cm nebo koncentraci solí nižší než 0,5 %), a nemělo by být příliš znečištěno amoniakem nebo zvířecí močí Lze použít rovněž komerční zahradní zeminu bez přísad nebo umělou půdu podle OECD (48), nebo jejich směs v poměru 50:50. Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrý. Jako chovné nádoby jsou vhodné nádoby o objemu 10 až 50 litrů.

Pro získání červů standardního stáří a hmotnosti je nejlépe založit kulturu se zámotky. Dospělí červi se proto vloží do chovné nádoby obsahující čerstvý substrát umožňující vytvoření zámotků. Praktické zkušenosti ukázaly, že k dobrým hodnotám reprodukce vede hustota populace přibližně 100 dospělých červů na 1 kg substrátu (hmotnost ve vlhkém stavu). Po 28 dnech se dospělí červi vyjmou. Žížaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (nejméně po dvou, ale po méně než dvanácti měsících).

Červy výše popsaných druhů lze považovat za zdravé, pokud se v substrátu pohybují, nepokoušejí se ze substrátu uniknout a nepřetržitě se rozmnožují. Velmi pomalý pohyb nebo žlutý zadní konec v případě *Eisenia fetida*) svědčí o vyčerpání substrátu. V takovém případě se doporučuje použít čerstvý substrát a/nebo snížit počet živočichů v nádobě.

Další vybrané odkazy

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Roupice

Doporučovaným zkušebním druhem je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (roupice bělavá). *Enchytraeus albidus* je jeden z největších druhů roupic (měří až 15 mm) z čeledi *Enchytraeidae*, řádu *Oligochaeta*, kmene *Annelida* a je celosvětově rozšířen, např. (8). *Enchytraeus albidus* lze nalézt v mořském, sladkovodním a suchozemském prostředí, zejména v rozkládajícím se organickém materiálu (chaluhách, kompostu) a pouze zřídkakdy na loukách (42). Tato široká ekologická tolerance a některé morfologické proměny naznačují, že tento druh může tvořit několik ras.

Enchytraeus albidus lze získat komerčně, protože se prodává jako krmivo pro ryby. Mělo by se ověřit, zda není kultura kontaminována jinými, obvykle menšími druhy (60). Pokud se znečištění objeví, omyjí se všechny roupice vodou v Petriho misce. Pomocí stereomikroskopu se následně vyberou velké dospělé exempláře *Enchytraeus albidus* jako počátek nové kultury. Všechny ostatní roupice se vyřadí. Tato roupice má krátký životní cyklus: dospělosti dosahuje mezi 33 dny (při 18 °C) až 74 dny (při 12 °C). Pro zkoušku mohou být použity pouze kultury, které byly bez problémů udržovány v laboratorních podmínkách minimálně 5 týdnů (jeden generační cyklus).

Jako zkušební organismy jsou vhodné i další druhy rodu *Enchytraeus,* zejména *Enchytraeus luxuriosus.* Tento druh je skutečným obyvatelem půdy, který byl nově popsán v (65). Pokud se použijí jiné druhy *Enchytraeus*, musí být jasně identifikovány a musí být logicky zdůvodněna volba druhu.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) je druh, který náleží ke stejné skupině jako *Enchytraeus luxuriosus*. Dosud nebylo s jistotou zjištěno, zda existuje ve volné přírodě, neboť byl popsán pouze v kulturách žížal a hromadách kompostu (Römbke 2003). Jeho původní ekologické požadavky proto nejsou známy. Nedávné laboratorní studie různých polních půd však potvrdily, že tento druh má širokou toleranci k vlastnostem půdy, jako je pH a struktura (Jänsch et al. 2005). Vzhledem k jednoduchosti jeho chovu a postupu zkoušení se v posledních letech tento druh velmi často používá při ekotoxikologických studiích, např. Kuperman et al. 2003). Avšak malá velikost (3–12 mm; v průměru 7 mm (Westheide & Müller 1996), je důvodem obtížnější manipulace s ním než s *Enchytraeus albidus*. Je-li použit tento druh namísto druhu *Enchytraeus albidus*, lze použít menší zkušební nádobu, není to však povinností. Navíc je potřeba vzít v úvahu, že tento druh se velmi rychle rozmnožuje – doba jeho reprodukce je kratší než 20 dnů při teplotě 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) a při vyšších teplotách ještě kratší.

Enchytraeidae druhu *Enchytraeus albidus* (právě tak jako jiné druhy *Enchytraeus* sp.) je možno chovat ve velkých plastových boxech (např. 30×60×10 cm nebo 20×12×8 cm, který je vhodnější pro pěstování menších červů) naplněných směsí umělé půdy a komerčně dostupné přírodní neznečištěné zahradní půdy. Kompostovaný materiál by se neměl používat, protože by mohl obsahovat toxické chemické látky, jakými jsou těžké kovy. Před použitím by měla být z chovné půdy odstraněna veškerá fauna trojnásobným hlubokým zmrazením. Je možné použít také neznečištěnou umělou půdu, ale ve srovnání s míchanými substráty by reprodukce mohla být pomalejší. Substrát by měl mít pH 6,0 ± 0,5. Kultura se udržuje v inkubátoru ve tmě při teplotě 15 ± 2 °C. V každém případě by teplota neměla být vyšší než 23 °C. Umělá/přírodní půda by měla být vlhká, ale ne mokrá. Pokud se půda jemně stlačí rukou, měly by se objevit pouze malé kapičky vody. V každém případě by se mělo zabránit vzniku anaerobních podmínek (např. pokud se použije víčko, mělo by mít dostatečný počet otvorů, který umožní dostatečnou výměnu vzduchu). Chovný substrát by měl být jednou týdně provzdušňován opatrným promícháváním.

▼M4

Roupice se krmí nejméně jednou týdně ad libitum ovesnými vločkami, které se umístí do dutiny na povrchy půdy a přikryjí se půdou. Pokud v nádobě zbude potrava od posledního krmení, mělo by se dodávané množství potravy odpovídajícím způsobem upravit. Pokud na zbylé potravě rostou plísně, měla by se nahradit novou dávkou ovesných vloček. Pro stimulaci reprodukce se do ovesných vloček může každé dva týdny přidat komerčně dostupný proteinový prášek s příměsí vitaminů. Po třech měsících se živočichové přemístí do čerstvě připravené kultury nebo chovného substrátu. Ovesné vločky, které se uchovávají v utěsněných nádobách, by se měly před použitím autoklávovat nebo zahřát, aby se zabránilo infikování roztoči (např. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) nebo dravými roztoči (např. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Po dezinfekci se potrava rozdrtí, takže ji lze snadno rozsypat po povrchu půdy. Dalším možným zdrojem potravy jsou pekařské kvasnice nebo krmení pro ryby TetraMin®.

Obecně jsou podmínky pro kultivaci dostatečné, pokud se roupice nepokoušejí uniknout ze substrátu, pohybují se půdou rychle, povrch jejich těla je lesklý bez ulpělých částic půdy, mají víceméně bělavé zabarvení a jsou viditelné roupice různého stáří. Roupice lze považovat za zdravé, pokud se nepřetržitě rozmnožují.

Další vybrané odkazy

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.