

31988L0302

30.5.1988

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 133/1

SMĚRNICE KOMISE

ze dne 18. listopadu 1987,

kteřou se po deváté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek

(88/302/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 67/548/EHS ze dne 27. června 1967 o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek ⁽¹⁾, ve znění šesté změny podle směrnice 79/831/EHS ⁽²⁾, a zejména na článek 19 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že čl. 3 odst. 2 směrnice 67/548/EHS stanoví, že fyzikálně-chemické vlastnosti, toxicita a ekotoxicita látek a přípravků se stanoví podle metod specifikovaných v příloze V;

vzhledem k tomu, že čl. 3 odst. 1 směrnice 67/548/EHS stanoví, že skutečná nebo potenciální nebezpečnost pro životní prostředí bude hodnocena podle vlastností stanovených v přílohách VII a VIII;

vzhledem k tomu, že příloha V, jak byla zavedena směrnicí 84/449/EHS ⁽³⁾, obsahuje v současné době pouze zkušební metody pro vlastnosti uvedené v příloze VII a je tedy nezbytné popsat zkušební metody pro vlastnosti uvedené v příloze VIII;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro přizpůsobení technickému pokroku směrnic pro odstranění technických překážek obchodu na úseku nebezpečných látek a přípravků,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Text přílohy této směrnice se doplňuje do přílohy v směrnice 67/548/EHS.

Článek 2

Členské státy přijmou a zveřejní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. prosince 1988. Neprodleně o nich uvědomí Komisi. Budou tyto předpisy používat nejpozději od 30. června 1989.

Článek 3

Tato směrnice je určena členskými státním.

V Bruselu dne 18. listopadu 1987.

Za Komisi

Stanley CLINTON DAVIS

člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. 196, 16.8.1967, s. 1/67.⁽²⁾ Úř. věst. L 259, 15.10.1979, s. 10.⁽³⁾ Úř. věst. L 251, 19.9.1984, s. 1.

PŘÍLOHA

Níže popsané zkušební metody slouží ke stanovení některých toxických a ekotoxických vlastností uvedených v příloze VIII směrnice Rady 79/831/EHS. Jsou zde popsány zkušební metody vhodné pro stupeň 1 a stupeň 2 podle přílohy VIII, nejsou však podle jednotlivých stupňů rozděleny.

OBSAH

ČÁST B: Metody stanovení toxicity	93
Obecný úvod: Část B	93
Zkouška subchronické orální toxicity: (90denní opakovaná orální aplikace na hlodavcích)	97
Zkouška subchronické orální toxicity: (90denní opakovaná orální aplikace na nehlodavcích)	101
Studie subchronické dermální toxicity: (90denní opakovaná kožní aplikace na hlodavcích)	105
Studie subchronické inhalační toxicity: (90denní opakovaná inhalační expozice na hlodavcích)	109
Zkouška teratogenity na hlodavcích a nehlodavcích	113
Zkouška chronické toxicity	116
Zkouška karcinogenity	121
Kombinovaná zkouška chronické toxicity a karcinogenity	126
Jednogeneční zkouška toxicity pro reprodukci	132
Dvougeneční zkouška toxicity pro reprodukci	136
Studie toxikokinetiky	140
Zkoušení mutagenity a screening karcinogenity	144
— Zkouška na genové mutace u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
— Zkouška na mitotickou rekombinaci u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	147
— Zkouška na genové mutace v savcích buňkách <i>in vitro</i>	150
— Zkouška na poškození a reparaci DNA – neplánovanou syntézu DNA – v savcích buňkách <i>in vitro</i>	153
— Zkouška na výměnu sesterských chromatid <i>in vitro</i>	157
— Zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví u <i>Drosophila melanogaster</i>	160
— Zkoušky na transformace savcích buněk <i>in vitro</i>	162
— Dominantní letální zkouška na hlodavcích	165
— Cytogenetická analýza savcích zárodečných buněk <i>in vivo</i>	168
— Spot test na myších	171
— Zkouška na dědičnou translokaci u myší	174
ČÁST C: Metody stanovení ekotoxicity:	177
Obecný úvod: Část C	177
Zkouška inhibice růstu řas	178
Toxicita pro žížaly: Zkouška na umělé půdě	184
Biologická rozložitelnost: Zahn-Wellensova zkouška	188
Biologická rozložitelnost: Simulační zkouška s aktivovaným kalem	195
Biologická rozložitelnost: Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu	207
Biologická rozložitelnost: Modifikovaná zkouška SCAS	212

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY**OBECNÝ ÚVOD: ČÁST B****DLOUHODOBÉ STUDIE**

Studie subchronické a chronické toxicity a studie karcinogenity

Charakterizace zkoušené látky a zkušební směsi

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.

Údaje o chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech mohou též poskytnout informaci o absorpčních charakteristikách u plánovaného způsobu podání a o možnostech metabolického zpracování a distribuce látky v tkáních. Mohou též existovat údaje o toxikokinetických parametrech z předešlých studií toxicity a z toxikokinetických studií.

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.

Pokusná zvířata: výběr druhu a kmene

Vzhledem k tomu, že je nezbytné zvířata exponovat po dobu představující převážnou část délky jejich života, existuje tendence omezit studie na poměrně krátce žijící zkušební druhy nevyžadující složitou péči. Je vysoce žádoucí, aby byl znám spontánní výskyt nemocí a tumorů u kmenů použitých zvířat, jsou-li chovány za srovnatelných podmínek.

Kmeny by měly být dobře charakterizovány a nesmí se u nich vyskytovat rušící vrozené vady. v tomto ohledu má určitou výhodu použití inbridních zvířat nebo hybridů F1; jsou-li však k dispozici dostatečné pozadíové údaje o outbridních kmenech, mohou být použity také zvířatech z definovaného zásobního chovu.

Péče o zvířata, podávání stravy a vody

Zkoušky a studie na zvířatech musí být prováděny v souladu s vnitrostátními předpisy a musí při nich být zohledněny lidské principy a mezinárodní vývoj v oblasti ochrany zvířat.

Mají-li být získány smysluplné výsledky, je nezbytná přísná kontrola podmínek prostředí a správná péče o zvířata. Podmínky chovu, chronická choroba, medikamentózní léčba, nečistoty ve stravě, vzduchu, vodě a stělivu a všeobecné podmínky chovu mohou významně ovlivnit výsledky studií při opakované dávce. Obecně by měl být znám účinek chemických sterilizačních prostředků na studii.

Strava musí splňovat veškeré požadavky na výživu zkušebnímu druhu a nesmí obsahovat nečistoty, které by mohly mít vliv na výsledky zkoušek. Hlodavci musí být zásobováni potravou a vodou *ad libitum*, přičemž jim musí být potrava vyměňována alespoň jednou týdně. v současnosti se používají tři typy stravy: běžná a syntetická strava a různé druhy speciálně složené stravy.

Bez ohledu na zvolený typ stravy musí dodavatelé periodickým sledováním zaručit nutriční hodnotu a obsah kontaminujících látek v základní stravě a musí tyto informace poskytnout laboratorům s každou šarží potravy. Je vysoce žádoucí, aby byly známy účinky potravního režimu na metabolismus na vznik tumorů a délku života.

Kromě toho může zkušební laboratoř provádět kontrolní analýzy stravy na složky krmiva i nežádoucí příměsi včetně karcinogenů. Provádějí-li se takové analýzy, jejich výsledky se uchovají a uvedou se v závěrečné zprávě o každé zkoušené látce.

Běžné složky stravy, o nichž je známo, že mají vliv na karcinogenezi (např. antioxidanty, nenasycené mastné kyseliny, selen) nesmějí být přítomny v rušivých koncentracích. Možný vliv řady známých kontaminujících látek obsažených ve stravě na posouzení karcinogenity vyžaduje, aby byla u stravy věnována zvláštní pozornost přítomnosti reziduí pesticidů, organochlorových sloučenin, polycyklických aromatických uhlovodků, estrogenů, těžkých kovů, nitrosaminů a mykotoxinů.

Podává-li se zkoušená látka ve vodě nebo v potravě, je nezbytné provést zkoušky stability. Na základě zkoušek stability a homogenity řádně provedených před studiem při opakované dávce lze stanovit, jak často má být strava připravována a sledována.

Při sterilizaci stravy musí být známy účinky takového ošetření na zkoušenou látku a složky stravy. v případě zjištění účinků musí být provedena vhodná úprava.

Při zkouškách karcinogenity si musí být experimentátoři vědomi možné přítomnosti kontaminujících látek v použité vodě. v zásadě vyhovuje pitná voda, přičemž by mělo být známo její složení.

Koncentrace zkoušené látky ve stravě se upravuje podle růstu zvířat, aby se udržoval přibližně konstantní příjem zkoušené látky na jednotku tělesné hmotnosti.

Kontrolní a zkušební strava by měly mít pokud možno podobnou nutriční hodnotu. Je tedy třeba vzít v úvahu nutriční hodnotu zkoušené látky přimíchané do stravy. Podle zkušenosti by méně než 5 % zkoušené látky, která nemá výživové vlastnosti, nemělo mít významnější vliv na nutriční hodnotu stravy.

1. Inhalační studie

Není stanovena limitní zkouška, neboť nebylo možné definovat jedinou limitní hodnotu pro inhalační expozici.

2. Studie teratogenity

Zkušební metody jsou primárně zaměřeny na orální podávání. v závislosti na fyzikálních vlastnostech zkoušené látky nebo na pravděpodobném způsobu expozice člověka lze použít jiné způsoby podávání. v takových případech se zkušební postup odpovídajícím způsobem upraví, přičemž se zohlední příslušná kritéria 28denních zkoušek.

3. Toxikokinetika

Toxikokinetické studie pomáhají při interpretaci a vyhodnocení údajů o toxicitě. Tyto studie jsou určeny k objasnění určitých aspektů toxicity zkoušené chemické látky a výsledky mohou pomoci při plánování dalších studií toxicity. Nepředpokládá se, že by bylo ve všech případech nezbytné stanovit všechny parametry. Pouze ve vzácných případech bude nezbytné provést úplnou řadu toxikokinetických studií (studií absorpce, vylučování, distribuce a metabolismu). Pro určité sloučeniny mohou být vhodné změny této řady nebo může stačit studie s jedinou dávkou.

Definice

Toxikokinetika:	studie absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování zkoušených látek;
Absorpce:	proces, kterým podaná látka vstupuje do těla;
Vylučování:	proces, kterým jsou podaná látka a/nebo její metabolity vyloučeny z těla;
Distribuce:	proces, kterým je absorbovaná látka a/nebo její metabolity rozděleny v těle;
Metabolismus:	proces, kterým je podaná látka v těle strukturně měněna enzymatickými nebo neenzymatickými reakcemi;

4. Akutní a subakutní studie na druhém zvířecím druhu

Účelem studie na druhém zvířecím druhu je doplnit závěry učiněné z první zkoušky.

V případě studie na druhém zvířecím druhu mohou být použity již popsání metody nebo mohou být upraveny pro menší počet zvířat.

5. Studie plodnosti

Je-li nezbytná třígenerační zkouška reprodukce (plodnosti), může být popsána metoda dvougenerační zkoušky reprodukce rozšířena tak, aby pokrývala třetí generaci.

6. Studie mutagenity

Doplňující zkoušky mutagenity včetně screeningových zkoušek karcinogenity

V příloze VIII směrnice se stanoví doplňující zkoušky pro vyšetření mutagenity nebo pro screening karcinogenity. Studie uvedené v tomto oddílu mohou být v zásadě použity pro oba účely.

Úvod

První posouzení mutagenní aktivity látky zahrnuje zkoušku na genové (bodové) mutace v bakteriích a zkoušku na cytogenetické poškození savčích buněk (*in vitro* nebo *in vivo*); vhodné metody pro tuto základní sadu byly popsány dříve. Tento oddíl se zabývá doplňujícími zkouškami, které jsou vhodné pro ověření a/nebo rozšíření výsledků základní sady a slouží pro další účely:

1. pro potvrzení výsledků získaných v základní sadě studií;
2. pro vyšetření ukazatelů, které nebyly zahrnuty do základní sady;
3. pro zahájení nebo prohloubení studií *in vivo*.

Pro tyto účely zahrnují popsané zkoušky eukaryotické systémy *in vivo* a *in vitro* a rozšířenou řadu biologických ukazatelů. Zkoušky poskytují informace o bodových mutacích u organismů, které jsou složitější než bakterie použité v základní sadě, a rozšiřují informace o schopnosti látky indukovat chromosomové aberace.

Jsou rovněž popsány zkoušky na jiné ukazatele než bodové mutace a chromosomové aberace. Poskytují doplňující informace a mohou být podle potřeby zařazeny do zkušebních schémat.

Obecně platí, že je-li zvažován program dalších studií mutagenity, měl by být navržen tak, aby poskytl příslušné doplňující informace o mutagenním a/nebo karcinogenním potenciálu látky.

Výběr studií, které mohou být vhodné pro daný případ, závisí na mnoha faktorech, včetně chemických a fyzikálních vlastností látky, výsledků základních bakteriálních a cytogenetických zkoušek, metabolického profilu látky, výsledků dalších studií toxicity a známých způsobů použití látky. Pevné schéma výběru zkoušek je tedy nevhodné, s ohledem na velký počet faktorů, které mohou vyžadovat zvážení. Určité obecné zásady však mohou sloužit jako vodítko. Byla-li zkouška v základní sadě pozitivní, měla by být mezi doplňkové studie zahrnuta alespoň jedna zkouška umožňující hodnotit tentýž genetický ukazatel. Pokud byly obě zkoušky v základní sadě negativní, měly by být jako doplňkové zkoušky obvykle provedeny zkoušky na genové mutace a chromosomové aberace. Může být rovněž vhodné získat doplňující údaje z indikátorových zkoušek (viz níže).

Metody pro tato vyšetřování jsou níže seskupeny na základě jejich hlavního (analyzovaného) genetického ukazatele:

Studie zkoumající genové (bodové) mutace

Pro další vyšetřování schopnosti látky vyvolávat genové (bodové) mutace lze použít jednu z následujících zkoušek:

- a) studie přímé nebo zpětné mutace u eukaryotických mikroorganismů (*Saccharomyces cerevisiae*);
- b) studie přímých mutací v savčích buňkách *in vitro*;
- c) zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophila melanogaster*;
- d) zkouška na somatické mutace buněk *in vivo*, spot test na myších.

Studie zkoumající chromosomové aberace

Pro další vyšetřování schopnosti látky vyvolávat chromosomové aberace lze použít jednu z následujících zkoušek:

- a) cytogenetické studie na savčích *in vivo*;

Měla by být vzata v úvahu analýza metafáze buněk kostní dřeně, pokud nebyla zařazena do základního vyšetření (studie základní sady). Kromě toho může být provedena také cytogenetická analýza zárodečných buněk *in vivo*;

- b) cyto genetická studie na savcích buňkách *in vitro*, pokud nebyla zařazena do základního vyšetření;
- c) dominantní letální zkouška na hlodavcích;
- d) zkouška na dědičnou translokaci u myší.

Indikátorové zkoušky na účinky na DNA

Jsou k dispozici metody, které poskytují důkaz některých účinků na DNA, avšak jejich analyzovaným ukazatelem nejsou ukazatele mutagenních účinků. Tyto studie mohou podat doplňující informace k výsledkům studií mutagenity a mohou být užitečné při interpretaci takových studií. v případě potřeby mohou být pro zkoumání těchto jevů vhodné následující metody používající eukaryotické mikroorganismy nebo buňky savců:

- a) mitotická rekombinace u *Saccharomyces cerevisiae*;
- b) poškození a reparace DNA – neplánovaná syntéza DNA v savcích buňkách – *in vitro*;
- c) výměna sesterských chromatid v savcích buňkách – *in vitro*.

Jiné indikátorové metody vyšetřování karcinogenního potenciálu

Zkoušky na transformaci savcích buněk umožňují měřit schopnost látky vyvolat změny morfologie a chování v buněčných kulturách, u nichž se předpokládá, že souvisejí s maligní transformací – *in vivo*. Použity mohou být různé typy buněk a různá kritéria transformace.

Posouzení rizika dědičných účinků u savců

Existuje několik metod pro měření dědičných účinků vyvolaných genetickými (bodovými) mutacemi u savců (např. zkouška na specifické umístění genů v chromosomu u myší⁽¹⁾) nebo pro chromosomové aberace (např. zkouška na přenosné translokace u myší). Tyto metody lze použít pro odhad možného genetického rizika, které látka představuje pro člověka. Vzhledem ke složitosti těchto zkoušek a k vysokému nezbytnému počtu zvířat, zejména pro zkoušku na specifické umístění genů v chromosomu, je však nezbytné dobré zdůvodnění před provedením těchto studií.

⁽¹⁾ Zkouška na specifické umístění genů v chromosomu u myší (není zařazena do tohoto dokumentu) může být použita pro měření mutace zárodečných buněk v první generaci po expozici mutagenní látce. Zkouška umožňuje detekovat a kvantifikovat genetické změny, které vedou ke změnám v genomovém produktu a projevují se viditelným fenotypem.

ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY

(90DENNÍ OPAKOVANÁ ORÁLNÍ APLIKACE NA HLODAVČÍCH)

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 orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat (hlodavců); každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. v průběhu období podávání 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 stanoveny.

1.6 Popis zkušební metody*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 zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Zkoušenou látku lze podávat v potravě, sondou, v kapslích nebo v pitné vodě. Mohou být použity i jiné prostředky podávání. Všem zvířatům se zkoušená látka podává po celou dobu zkoušky stejnou metodou. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí o nich být známo, že nemají toxické účinky. Podle možnosti lze použít dřívější údaje.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Přednostně se používá potkan, pokud neexistují důvody proti tomu. Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů, v ideálním případě by na počátku podávání látky měli být potkani mladší než 6 týdnů, v žádném případě by neměli být starší než 8 týdnů. Na začátku studie by neměly odchytky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). 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.

Úrovně dávek

Měly by být použity nejméně tři úrovně dávek a jedna kontrolní skupina. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, podává 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. Použije-li 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.

Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace v potravě (v ppm nebo $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ potravy), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Podává-li se látka sondou, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu. Dávkování by se mělo podle potřeby v pravidelných intervalech (týdenních nebo čtrnáctidenních) přizpůsobovat, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

Limitní zkouška

Pokud 90denní zkouška provedená níže popsanou metodou nevyvolá žádné toxické účinky při úrovni dávky $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den nebo při vyšší dávce odpovídající možné expozici člověka, je-li známa, není další zkoušení potřebné. Podává-li se látka o nízké toxicitě v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství ani další vlastnosti zkoušené látky nebránily normální výživě zvířat.

Doba pozorování

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se známky toxicity včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

Postup

Zkoušená látka se v ideálním případě zvířatům podává sedm 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.

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 spotřeby vody při podávání zkoušené látky v pitné vodě) 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:

- 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;
- 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, změní se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;
- 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 hladování se volí podle živočišného druhu), hladiny sérové

glutamát-pyruvát transaminasy⁽¹⁾, glutamát-oxalacetát transaminasy⁽²⁾, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyl-transpeptidasy, 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/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přídavné 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 dřeví, (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 orgánů a tkání se provede u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny.
- b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.
- c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.
- d) Plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří k zjištění příznaků infekce, neboť to umožňuje vhodné posouzení zdravotního stavu zvířat. Zváží se histopatologické vyšetření jater a ledvin u těchto skupin. 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,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud je použito) a koncentrace,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,

(¹) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

(²) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

- 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,
- 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.

ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY

(90DENNÍ OPAKOVANÁ ORÁLNÍ APLIKACE NA NEHLODAVČÍCH)

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 orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat (nehlodavců); každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. v průběhu období podávání 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*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 zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Zkoušenou látku lze podávat v potravě nebo může být vhodnější podávání v kapslích. Mohou být použity jiné způsoby orálního podávání. Všem zvířatům se zkoušená látka podává po celou dobu zkoušky stejnou metodou. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí o nich být známo, že nemají toxické účinky. Podle možnosti lze použít dřívější údaje.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Obvykle se jako živočišný druh – nehlodavec – používá pes, přičemž se dává přednost definovanému plemeni. Mohou být použity jiné druhy nehlodavců. Použijí se mladá zdravá zvířata; v případě psů se s podáváním začne ve věku od čtyř do šesti měsíců a ne později než v devíti měsících věku. Provádí-li se zkouška subchronické orální toxicity jako předběžná studie před dlouhodobou zkouškou, měl by být v obou zkouškách použit stejný živočišný druh a plemeno.

Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně osm zvířat (čtyři samice a čtyři samci). Počet zvířat na konci pokusu musí být takový, aby umožnil vyhodnocení toxických účinků.

Úrovně dávek

Měly by být použity nejméně tři úrovně dávek a jedna kontrolní skupina. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxické účinky, avšak nezpůsobit žádná 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. Použije-li se více než jedna mezilehlá úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky.

Ve skupině s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by k uhynutí rovněž nemělo docházet.

Podává-li se látka o nízké toxicitě v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství, ani další vlastnosti zkoušené látky nebránily normální výživě zvířat.

Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace v potravě (v ppm nebo $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ potravy), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Podává-li se látka přímo, například v kapslích, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by se mělo podle potřeby v týdenních intervalech přizpůsobovat, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Provádí-li se zkouška subchronické orální toxicity jako předběžná zkouška před dlouhodobou zkouškou, měla by být obvykle v obou studiích použita stejná strava.

Limitní zkouška

Pokud 90denní zkouška provedená níže popsanou metodou nevyvolá žádné toxické účinky při úrovni dávky $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den nebo při vyšší dávce odpovídající možné expozici člověka, je-li známa, není další zkoušení potřebné. Podává-li se látka o nízké toxicitě v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství ani další vlastnosti zkoušené látky nebránily normální výživě zvířat.

Doba pozorování

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se známky toxicity včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

Postup

Zkoušená látka se v ideálním případě zvířatům podává sedm dní v týdnu po dobu 90 dnů. Podává-li se však látka jiným způsobem než v potravě, považuje se z praktických důvodů za přijatelné podávat látku 5 dní v týdnu.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování, avšak neomezuje se pouze na ně. Měření spotřeby potravy (a spotřeby vody při podávání zkoušené látky v pitné vodě) a hmotnosti zvířat se provádějí týdně.

Nejméně jednou denně se provádějí pečlivá klinická vyšetření s vhodnými opatřeními k minimalizaci ztrát zvířat pro zkoušku. Po ukončení doby expozice se pitvají všechna zvířata, která přežila. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provádějí následující vyšetření:

- oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným vhodným přístrojem se provede před podáváním 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;
- na začátku zkoušky, poté buď v měsíčních intervalech, nebo uprostřed zkoušky a poté 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;
- na začátku zkoušky, poté buď v měsíčních intervalech, nebo uprostřed zkoušky, a poté 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 nebo plemene), hladiny sérové glutamát-pyruvát transaminasy (⁽¹⁾), glutamát-oxalacetát transaminasy (⁽²⁾), ornitindekarboxylasy, gama

(¹) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

(²) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

-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. Před odběrem vzorků krve by nehlodavci měli hladovět (ne více než 24 h);

d) analýza moči se běžně nevyžaduje, provádí se pouze na základě očekávané nebo pozorované toxicity.

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, štítná žláza (s příštítnými tělísky) 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/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, (průdušnice), plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přídavné pohlavní orgány), (kůže), žlučník, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch), (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní). Tkáně v závorkách se vyšetřují pouze v případech, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

Histopatologická vyšetření

Úplné histopatologické vyšetření orgánů a tkání se provede u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny. Histopatologické vyšetření zvířat z dalších dávkových skupin se provede na orgánech, u kterých byly nalezeny léze u skupiny s nejvyšší dávkou, nebo je-li to potřebné na základě klinických pozorování.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, typy lézí 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, plemeno nebo 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 (se zvláštním důrazem na klinické nálezy),
- 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),
- pitevnické 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.

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*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 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 v případě potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou popřípadě vhodným vehikulem, aby byl zajištěn dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují nereděné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

*Zkušební podmínky**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. Provádí-li se subchronická dermální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

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) aplikována vysoká úroveň dávky po dobu 90 dnů a 28 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

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 pravidelné (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přízpusobeno, 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. Používá-li 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. Použije-li 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. Došlo-li k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

Limitní zkouška

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg·kg⁻¹ nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, je-li známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

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.

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 nejstejnější 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 obvas 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:

- 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;
- 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/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, (průdušnice), plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, žlučník (je-li přítomen), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), (hrudní kost s kostní dřeví), (kost stehenní včetně kloubních ploch), (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní) a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se vyšetřují v pouze 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.
- 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, typy lézí a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

(¹) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

(²) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

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,
- úroveň 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,
- 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.

STUDIE SUBCHRONICKÉ INHALAČNÍ TOXICITY

(90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVČÍCH)

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

Několik skupin pokusných zvířat se denně po 90 dní vystaví po definovanou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Je-li použito pro usnadnění přípravy vhodné koncentrace zkoušené látky v ovzduší vehikulum, použije se kontrolní skupina exponovaná vehikulu. 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*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 zvířat, která se náhodně přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí o nich být známo, že nemají toxické účinky. Podle možnosti lze použít dřívější údaje.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Přednostně se používá potkan, pokud neexistují důvody proti tomu. Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty. Provádí-li se subchronická inhalační studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

Počet a pohlaví

Pro každou úroveň koncentrace se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). 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 koncentrace po dobu 90 dní a 28 dní po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

Expoziční koncentrace

Použijí se nejméně tři koncentrace a kontrolní skupina nebo, v případě použití vehikula, kontrolní skupina s vehikulem (v koncentraci odpovídající koncentraci vehikula při nejvyšší úrovni zkoušené látky). S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Nejvyšší koncentrace by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší koncentrace tuto hodnotu překračovat. v ideálním případě by střední úroveň koncentrace měla vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna mezilehlá úroveň koncentrace, 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.

Doba expozice

Denní expozice má trvat 6 hodin od ustavení rovnováhy koncentrace v expoziční komoře. Mají-li být splněny specifické požadavky, musí se zvolit jiná doba.

Zařízení

Pro pokusy se zvířaty by měla být použita inhalační zařízení, která umožňují dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat stísněnost pokusných zvířat a maximalizovat inhalační expozici zkoušené látky. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový objem, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít orálně-nasální expozici nebo expozici hlavy nebo expozici celého těla v samostatné expoziční komoře; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

Doba pozorování

Zvířata se pozorují denně během expozice a zotavování s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

Postup

Zvířata se vystaví zkoušené látce denně, pět až sedm dnů 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. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost má být v ideálním případě udržována mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. u zkoušek některých aerosolů). Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Použije se dynamický inhalační systém s vhodným kontrolním analytickým systémem pro regulaci koncentrace. Aby bylo dosaženo vyhovujících koncentrací, doporučuje se provést předběžný experiment. Průtok by měl být nastaven tak, aby zajistil homogenní podmínky v celé expoziční komoře. Systém by měl zajistit, že stálých podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- a) průtok vzduchu (kontinuálně);
- b) skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně. Během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. u některých aerosolů však nelze této úrovně regulace dosáhnout a připouští se větší rozsah kolísání. Během celé studie mají být každodenní koncentrace co nejstálější. Při vývoji generátoru aerosolu je třeba analyzovat velikosti částic tak, aby byla ustavena stabilní koncentrace aerosolu. Během expozice se co nejčastěji provádí analýza za účelem zjištění konzistence distribuce velikosti částic;
- c) teplota a vlhkost;
- d) během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich 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. Po ukončení doby expozice se pitvají všechna zvířata, která přežila. 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, změřit se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;
- 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 močovinny, 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, zvaží se stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem expozice.

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 zvaží, 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, plíce – vyjmou se neporušeny, zvaží se a fixují vhodným médiem tak, aby se zachovala struktura plic (za vhodný postup se považuje perfusní fixace), tkáň nasofaryngu, mozek – v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice, plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přídatné pohlavní orgány), (kůže), žlučník (je-li přítomen), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch) a (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní). Tkáně v závorkách se vyšetřují v pouze případě, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

Histopatologická vyšetření

- a) Úplné histopatologické vyšetření respiračního systému a ostatních orgánů a tkání se provede u všech zvířat kontrolní skupiny a u zvířat skupiny, která byla exponována nejvyšší koncentrací.
- b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.
- c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.
- d) Plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří, 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 koncentrací.
- e) V případě použití satelitní skupiny se provede histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

(⁽¹⁾) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

(⁽²⁾) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí 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:

Popis expozičního zařízení: včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému, popisu čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu.

Údaje o expozici: zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky) a měly by pokud možno zahrnovat tyto informace:

a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;

b) teplota a vlhkost vzduchu;

c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení dělené objemem vzduchu);

d) povaha vehikula, pokud bylo použito;

e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;

f) medián velikosti částic (podle možnosti):

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a koncentrace,

— 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,

— 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.

ZKOUŠKA TERATOGENITY NA HLODAVČÍCH a NEHLODAVČÍCH

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 v odstupňovaných dávkách nebo koncentracích několika skupinám březích pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky, alespoň v tom období březosti, ve kterém dochází k organogenezi. Krátce před očekávaným datem vrhu jsou březí samice utráceny a jejich děloha i s obsahem je vyšetřena. Tato zkušební metoda zahrnuje studium embryo- a fetotoxicity.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody*Příprava*

Zdravé mladé dospělé samice, které nikdy nebyly březí, stejného věku a velikosti jsou aklimatizovány při laboratorních podmínkách alespoň pět dní před započítáním zkoušky a poté jsou připuštěni samci s ověřenou plodností. Proveďte se náhodný výběr oplozených samic, které se rozdělí do experimentálních skupin.

Oplození může být zajištěno přirozenou cestou nebo umělou inseminací. Zkoušená látka je podávána samicím denně, podávání začíná časně po implantaci a pokračuje během období organogeneze. Den před termínem se plody vyjmou hysterektomií a podrobí se sledování abnormalit skeletu a vnitřních orgánů včetně sledování zpomaleného růstu, opožděné osifikace a krvácení do střeva.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Běžně používanými druhy jsou potkan, myš, křeček a králík. Upřednostňovanými druhy jsou potkan a králík. Použijí se běžně užívané laboratorní kmeny. Používaný kmen by neměl mít nízkou plodnost a měly by u něj být známy reakce na teratogeny. Zvířata jsou chována jednotlivě.

Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávky je třeba použít alespoň 20 březích potkanů, myší nebo křečků nebo 12 březích králíků. Cílem je zajistit dostatečný počet vrhů a mláďat pro hodnocení teratogenního potenciálu látky.

Úrovně dávek

Měly by být použity nejméně tři úrovně dávek a jedna kontrolní skupina. Podává-li se zkoušená látka ve vehikulu, použije se také kontrolní skupina s vehikulem. Je-li použito vehikulum, je třeba také znát jeho toxikologické vlastnosti; nesmí být teratogenní a nesmí mít ani vliv na reprodukci. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zachází stejně jako se zvířaty

v experimentálních skupinách. Pokud to fyzikálně-chemické nebo biologické vlastnosti dovolují, měla by nejvyšší dávka zkoušené látky v ideálním případě u matek vyvolat takové projevy toxicity, jako je mírné snížení váhy, avšak ne více než 10 % úmrtí. Nízká úroveň dávek by neměla vyvolat pozorovatelné účinky, které by mohly být připisovány zkoušené látce. Rozložení mezilehlých dávek mezi nízkou a vysokou dávkou by mělo tvořit geometrickou řadu.

Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg·kg⁻¹ žádné důkazy o embryotoxicitě nebo teratogenitě, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné.

Doba expozice

Dnem 0 je u zkoušky den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie (pokud je to možné). Doba aplikace by měla zahrnovat období hlavní organogeneze. Za toto období je možno považovat 6. až 15. den u potkana a myši, 6. až 14. den u křečka a 6. až 18. den u králíka. v případě, že se za den 0 považuje den, kdy bylo pozorováno páření nebo byla provedena umělá inseminace, připočte se k předchozím údajům jeden den. Alternativně může být aplikace ukončena jeden den před očekávaným vrhem.

Doba pozorování

Každý den se provádí pečlivé klinické vyšetření. Denně se provádějí další pozorování a vhodná opatření k minimalizaci ztrát zvířat pro studii.

Postup

Zkoušená látka se podává orálně sondou. Zkoušená látka se podává denně přibližně ve stejnou dobu.

Zkušebními samicím se podává zkoušená látka denně po celé příslušné období testu. Dávka může být vztažena na hmotnost samic na počátku podávání látky nebo, vzhledem k rychlému nárůstu hmotnosti během březosti, mohou být zvířata pravidelně vážena a dávka může být upravována podle posledního vážení. Znamky toxicity se zaznamenávají denně ihned po zjištění, včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného vrhu se utratí a řádně makroskopicky vyšetří. v pozorování po ukončení podávání látky se pokračuje až do přibližně jednoho dne před vrhem; účelem je postihnout většinu období březosti, ale vyhnout se komplikacím při interpretaci výsledků po přirozeném vrhu. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování, avšak neomezuje se pouze na ně. Týdně se měří spotřeba potravy. Zvířata se týdně váží.

Pitva

Při uhynutí během studie nebo na jejím konci se samice makroskopicky vyšetří na morfologické abnormality nebo patologické změny, které mohly mít vliv na průběh březosti. Ihned po smrti se odstraní děloha a její obsah se vyšetří, pokud jde o úmrtí embryí a zárodků a počet živých zárodků. Obvykle je možné určit dobu úmrtí zárodků v děloze, jestliže k němu dojde. u potkanů a králíků je možné stanovit počet žlutých tělísek. Určí se pohlaví zárodků, zaznamená se hmotnost jednotlivých zárodků a vypočte se průměrná hmotnost zárodku. Po vyjmutí se každý zárodek vyšetří zevně. u potkanů, myši a křečků se vyšetří kosterní abnormality u zhruba jedné třetiny až poloviny vrhu a u zbytku se vhodnými metodami vyšetří abnormality měkkých tkání. u králíků se každý zárodek důkladně vyšetří pitvou z hlediska abnormalit vnitřností a poté skeletu.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která jsou březí, počet a procento živých zárodků a zárodků s abnormalitami skeletu nebo měkkých tkání a vztah výskytu abnormalit a určitých vrhů. 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,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud je použito) a koncentrace,
- údaje o toxických reakcích podle dávky,
- úroveň bez účinku (pokud ji lze stanovit),
- doba uhynutí během experimentu nebo 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,
- délka březosti a údaje o vrhu (včetně dřívějších údajů),
- údaje o zárodcích (živé/mrtvé plody, pohlaví, defekty měkkých tkání a skeletu),
- údaje o jednotlivých vrzích (živé/mrtvé plody, pohlaví, defekty měkkých tkání a skeletu pro každý vrh),
- statistické vyhodnocení výsledků,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 Hodnocení a interpretace

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY

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 obvykle podává vhodnou cestou sedm dní v týdnu, několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po větší část života zvířat. Během expozice zkoušené látce a po expozici se zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody*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 zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Upřednostňuje se potkan. Na základě předchozích studií je možné použít i jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů a s expozicí se začne co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh, plemeno a kmen.

Počet a pohlaví

U hlodavců se použije nejméně 40 zvířat (20 samic a 20 samců) pro každou úroveň dávky a pro souběžnou kontrolní skupinu. 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.

V případě nehlodavců je přijatelný menší počet zvířat, avšak alespoň čtyři od každého pohlaví ve skupině.

Úrovně dávek a frekvence expozic

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat zřetelné známky toxicity, ale neměla by způsobit nadměrnou letalitu. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně. Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se souběžná neexponovaná kontrolní skupina. S negativní kontrolní skupinou se zachází stejně jako s experimentálními skupinami, pouze se zvířata neexponují zkoušené látce ani žádnému vehikulu.

Způsob podávání

Dvěma hlavními způsoby podávání jsou orální a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

Použití dermální aplikace vyvolává značné praktické problémy. Chronická systémová toxicita v důsledku kožního vstřebání může být obvykle odvozena z výsledku orálního testu a znalostí rozsahu kožního vstřebávání zjištěných z předchozích zkoušek dermální toxicity.

Orální studie

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu.

Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích.

V ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

Inhalační studie

Protože jsou inhalační studie technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o tomto způsobu podávání. Je třeba také poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v expoziční komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expoziční komory. v obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při prvním z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

Expoziční komory

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně;
- ii) koncentrace: během denní expozice se nemá koncentrace zkoušené látky lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %;
- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí 22 ± 2 °C a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly kontinuálně kontrolovány oba parametry;
- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozice pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

Délka studie

Období podávání by mělo trvat nejméně 12 měsíců.

Postup

Pozorování

Nejméně jednou denně se provádí pečlivé klinické vyšetření. Denně se provádějí dodatečná pozorování s odpovídajícími zákroky k minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitva nebo uložení zvířat, která jsou nalezena mrtvá, do lednice a izolace nebo utracení zvířat, která jsou slabá nebo v agónii. Je třeba provádět pečlivá pozorování, aby se spolehlivě zachytil nástup a progresse všech toxických účinků a minimalizovaly se ztráty v důsledku nemoci, autolýzy nebo kanibalismu.

Zaznamenávají se klinické příznaky, včetně neurologických a očních změn u všech zvířat, a dále případy uhybnutí. Zaznamenává se doba nástupu a postup toxických příznaků včetně podezření na tumor.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období. Měření spotřeby potravy se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně ve tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

Hematologická vyšetření

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček nebo jiné ukazatele srážlivosti) se provádějí po třech měsících, šesti měsících a poté přibližně v šestiměsíčních intervalech a po ukončení na vzorcích krve shromážděných od všech nehlodavců a od 10 potkanů každého pohlaví z každé skupiny. Vzorky se ve všech intervalech odeberou pokud možno od stejných potkanů. Kromě toho se před zkouškou odebere vzorek od nehlodavců.

Pokud klinické vyšetření zvířat naznačí zhoršený zdravotní stav zvířat během studie, měl by být stanoven diferenciální obraz bílých krvinek postižených zvířat.

Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje u skupiny (skupin) s nejbližší nižší dávkou pouze tehdy, jsou-li mezi skupinou s nejvyšší dávkou a kontrolními skupinami významné odchylky nebo pokud to indikují patologické nálezy.

Analýza moči

Pro analýzu moči se shromažďují vzorky od všech nehlodavců a od 10 potkanů každého pohlaví z každé skupiny, pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologická vyšetření. u hlodavců se provádějí následující stanovení buď na vzorcích jednotlivých zvířat, nebo na smíšeném vzorku pro pohlaví/skupinu:

— vzhled moči: objem a hustota u jednotlivých zvířat,

- bílkoviny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semikvantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semikvantitativně).

Biochemické vyšetření

V přibližně šestiměsíčních intervalech a po ukončení studie se odeberou krevní vzorky pro biochemická měření od všech nehlodavců a od 10 potkanů obojího pohlaví z každé skupiny, pokud možno od týchž potkanů v každém intervalu. Kromě toho se před zkušou odeberou vzorky od nehlodavců. Z těchto vzorků se připraví plasma a provedou se následující zkoušky:

- celková koncentrace bílkovin,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita basické fosfatasy, aktivita glutamát-pyruvát-transaminasy ⁽¹⁾, glutamát-oxalacetát-transaminasy, gama-glutamyltranspeptidasy ⁽²⁾, ornitindekarboxylasy,
- metabolismus glycidů, např. glukosa v krvi na lačno,
- testy na funkci ledvin, např. dusík močoviny v krvi.

Pitva

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agónii, se provede pitva. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné léze, tumory nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovají. Měl by být proveden pokus porovnat anatomicko-patologické změny s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně se uchovají pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozek ⁽³⁾ (v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku), podvěsek mozkový, štítná žláza (včetně příštítných tělísek), thymus, plíce (včetně průdušnice), srdce, aorta, slinné žlázy, játra ⁽³⁾, slezina, ledviny ⁽³⁾, nadledviny ⁽³⁾, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, děloha, močový měchýř, lymfatické uzliny, slinivka, gonády ⁽³⁾, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčné žlázy, kůže, svalovina, periferní nerv, mícha (krční, hrudní a bederní), sternum s kostní dřeví a stehenní kost (včetně kloubu) a oči. Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. Ve speciálních studiích, jako jsou inhalační studie, se studuje celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, měly by být informace získané z těchto procedur k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou být patologovi významným vodítkem.

Histopatologická vyšetření

Všechny viditelné změny, zejména tumory a jiné léze vyskytující se v kterémkoli orgánu, se zkoumají mikroskopicky. Kromě toho se doporučují následující postupy:

- a) mikroskopické vyšetření všech uchovaných orgánů a tkání s kompletním popisem všech lézí nalezených
 1. u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie;
 2. u všech zvířat ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny;
- b) orgány či tkáně vykazující abnormality způsobené nebo pravděpodobně způsobené zkoušenou látkou se zkoumají také ve skupinách s nižšími dávkami;
- c) prokazují-li výsledky významné zkrácení normální délky života zvířat nebo vyvolání účinků, které by mohly ovlivnit toxickou reakci, vyšetří se výše popsáním způsobem skupina s nejbližší nižší dávkou;
- d) informace o výskytu lézí, které se obvykle vyskytují v použitém kmeni zvířat za stejných laboratorních podmínek, tj. údaje o kontrolách z dřívějších studií, jsou nezbytné pro správné posouzení významnosti změn pozorovaných u exponovaných zvířat.

⁽¹⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

⁽³⁾ Tyto orgány odebrané deseti zvířatům každého pohlaví u hlodavců a všem nehlodavcům, a dále štítná žláza (včetně příštítných tělísek) od všech nehlodavců, se zváží.

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:

popis expozičního zařízení:

včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic a aerosolů, klimatizačního systému, popis čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu;

údaje o expozici:

zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:

a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;

b) teplota a vlhkost vzduchu;

c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení dělené objemem vzduchu);

d) druh vehikula, pokud bylo použito;

e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;

f) medián velikosti částic (podle možnosti);

— úroveň dávek (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,

— úroveň bez účinku,

— 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 všech analýz moči),

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické zpracování 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.

ZKOUŠKA KARCINOGENITY

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 obvykle sedm dní v týdnu vhodnou cestou několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po větší část života zvířat. Během expozice zkoušené látky a po expozici se zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity, zejména vývinu tumoru.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody

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 zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Pokusná zvířata

Na základě předchozích studií je možné použít jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Používají se zdravá mladá zvířata běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat. Expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh, plemeno a kmen.

Počet a pohlaví

U hlodavců se použije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávek a pro souběžnou kontrolní skupinu. 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.

Úrovně dávek a frekvence expozic

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10 %), bez podstatnějších změn normální doby života v důsledku jiných účinků než tumorů.

Nejnižší úroveň dávky by neměla mít vliv na normální růst, vývoj a délku života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10 % nejvyšší dávky.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr úrovní dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně. Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se další kontrolní skupina, která není exponována vehikulu.

Způsob podávání

Třemi hlavními způsoby podávání jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

Orální studie

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu. Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích.

V ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

Dermální studie

Dermální expozice nanesením přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty expozice u člověka a jako modelový systém vyvolání kožních lézí.

Inhalační studie

Protože jsou inhalační studie technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o tomto způsobu podávání. Je třeba poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v inhalační komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expozičního komory. v obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky.

Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při první z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

Expoziční komory

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně;
- ii) koncentrace: během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. Každodenní koncentrace mají být během celé studie co nejstálější;
- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí 22 ± 2 °C a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly oba parametry kontrolovány kontinuálně;
- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozice pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

Délka studie

Zkouška karcinogenity zahrnuje větší část obvyklé doby života pokusných zvířat. Zkouška by měla být ukončena po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana; u některých kmenů zvířat s delší dobou života a/nebo s nízkým spontánním výskytem tumorů by však měla být ukončena po 24 měsících (u myši a křečka) a po 30 měsících (u potkana). Ukončení takové prodloužené studie je také přijatelné, pokud počet přežívajících zvířat ve skupině s nejnižší dávkou nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení zkoušky, ve které je zřetelný rozdíl v reakci u různých pohlaví, se každé pohlaví posuzuje zvlášť. Pokud předčasně uhynie ze zjevných toxických příčin jen skupina s vysokou dávkou, nemusí to nutně vést k ukončení celé zkoušky za předpokladu, že toxické projevy nečiní problémy u ostatních skupin. Negativní výsledek zkoušky lze uznat, pokud nejsou ztráty zvířat v důsledku autolýzy, kanibalismu nebo laboratorně-technických chyb v žádné skupině větší než 10 % a přežití ve všech skupinách neklesne pod 50 % po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana.

Postup

Pozorování

Denní pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomie a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování.

Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Klinické příznaky a mortalita se zaznamenávají u všech zvířat. Zvláštní pozornost se věnuje vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného nebo hmatného tumoru se zaznamenává.

Měření spotřeby potravy (a vody, je-li zkoušená látka podávána v pitné vodě) se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně ve tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období.

Klinická vyšetření

Hematologie

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studie, provede se stanovení diferenciálního obrazu bílých krvinek postižených zvířat.

Po 12 měsících, 18 měsících a před utracením zvířat se provede krevní nátěr od všech zvířat. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Pokud je to podle údajů, zejména údajů získaných před utracením nebo údajů z vyšetření patologických změn, nutné, vyšetří se diferenciální obraz i u skupiny s nejbližší nižší dávkou.

Pitva

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agonii, se provede kompletní pitva. Všechny viditelné tumory nebo léze nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovají.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: mozek (v řezech medulla/pons, kůra mozku a mozečku), podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, kůže, jícn, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, samičí mléčná žláza, stehenní sval, periferní nerv, hrudní kost s kostní dřeví, kost stehenní (včetně kloubu), mícha ve třech úrovních (krční, střední hrudní a bederní) a oči.

Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. v inhalačních studiích se uchovává celý respirační trakt včetně dutiny nosní, hltanu a hrtanu.

Histopatologická vyšetření

- a) Úplné histopatologické vyšetření orgánů a tkání se provede u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie, u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny.
- b) Všechny tumory viditelné okem a léze, které by mohly být tumory, se mikroskopicky vyšetří u všech skupin.
- c) Je-li významný rozdíl ve výskytu neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, provede se histopatologické vyšetření v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách.
- d) Je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrolní skupiny, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou.
- e) Jsou-li ve skupině s vysokou dávkou důkazy o vyvolání toxických nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou odpověď, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší úrovní dávky.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících tumory zjištěné během zkoušky, doba jejich zjištění a počet zvířat s tumory po utracení. 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:
 - popis expozičního zařízení:
 - včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému, popisu čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu;
 - údaje o expozici:
 - zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:
 - a) průtok vzduchu inhalačním zařízením,
 - b) teplota a vlhkost vzduchu,
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení dělené objemem vzduchu),
 - d) druh vehikula, pokud bylo použito,
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně,
 - f) medián velikosti částic (podle možnosti):
 - úroveň dávek (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
 - incidence tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
 - doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
 - výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky,
 - popis toxických nebo jiných účinků,
 - doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
 - údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
 - provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
 - pitevnické nálezy,
 - podrobný popis všech histopatologických nálezů,
 - statistické zpracování výsledků a popis použitých metod,
 - diskuse o výsledcích,
 - interpretace výsledků.

3.2 **Hodnocení a interpretace**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

KOMBINOVANÁ ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY a KARCINOGENITY

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

Cílem kombinované zkoušky chronické toxicity/karcinogenity je stanovit chronické a karcinogenní účinky látky u některého druhu savců po dlouhodobé expozici.

Pro tento účel je zkouška karcinogenity doplněna alespoň jednou exponovanou satelitní skupinou a kontrolní satelitní skupinou. Dávka použitá pro tuto exponovanou satelitní skupinu může být vyšší než nejvyšší dávka použitá při zkoušce karcinogenity. Zvířata ve zkoušce karcinogenity se vyšetřují jak na obecnou toxicitu, tak na reakci na karcinogenní účinky. Zvířata v exponované satelitní skupině se vyšetřují na obecnou toxicitu.

Zkoušená látka se obvykle podává vhodnou cestou sedm dní v týdnu, několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po většinu života zvířat. Během expozice zkoušené látky a po expozici se pokusná zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity, zejména vývinu tumoru.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody

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 zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Pokusná zvířata

Upřednostňuje se potkan. Na základě předchozích studií je možné použít i jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Používají se zdravá mladá zvířata z běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat; expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a plemeno/kmen.

Počet a pohlaví

U hlodavců se použije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávek a pro souběžnou kontrolní skupinu. 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.

Exponovaná satelitní skupina (nebo skupiny) pro hodnocení patologie jiné, než jsou tumory, by měla obsahovat 20 zvířat každého pohlaví, zatímco satelitní kontrolní skupina by měla obsahovat 10 zvířat každého pohlaví.

Úrovně dávek a frekvence expozič

Pro zkoušení karcinogenity se použijí alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10 %), bez podstatnějších změn normální doby života v důsledku jiných účinků než tumorů.

Nejnižší úroveň dávky by neměla mít vliv na normální růst, vývoj a délku života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10 % nejvyšší dávky.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Pro účely zkoušení chronické toxicity se do zkoušky zahrnou další exponované skupiny a souběžná satelitní kontrolní skupina. Vysoká dávka by měla u exponovaných zvířat v satelitní skupině vyvolat zřetelné příznaky toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně. Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se další kontrolní skupina, která není exponována vehikulu.

Způsob podávání

Třemi hlavními způsoby podávání jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

Orální studie

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu. Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích. v ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

Dermální studie

Dermální expozice nanesením přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty expozice u člověka a jako modelový systém vyvolání kožních lézí.

Inhalační studie

Protože inhalační studie jsou technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobnější informace o tomto způsobu podávání. Je třeba poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v inhalační komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expozičního komory. v obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při první z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

Expoziční komory

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci a vzhled, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech, kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zauímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně;
- ii) koncentrace: během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. Každodenní koncentrace mají být během celé studie co nejstálější;
- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí 22 ± 2 °C a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly oba parametry kontrolovány kontinuálně;
- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozic pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

Délka studie

Zkouška karcinogenity zahrnuje větší část normální doby života pokusného zvířete. Zkouška by měla být ukončena po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana; u některých kmenů zvířat s delší dobou života a/nebo s nízkým spontánním výskytem tumorů by však měla být ukončena po 24 měsících (u myši a křečka) a po 30 měsících (u potkana). Ukončení takové prodloužené studie je také přijatelné, pokud počet přežívajících zvířat ve skupině s nejnižší dávkou nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení zkoušky, ve které je zřetelný rozdíl v reakci u různých pohlaví, se každé pohlaví posuzuje zvlášť. Pokud předčasně uhne ze zjevných toxických příčin jen skupina s vysokou dávkou, nemusí to nutně vést k ukončení celé zkoušky za předpokladu, že toxické projevy nečiní problémy u ostatních skupin. Negativní výsledek zkoušky lze uznat, pokud nejsou ztráty zvířat v důsledku autolýzy, kanibalismu nebo laboratorně-technických chyb v žádné skupině větší než 10 % a přežití ve všech skupinách neklesne pod 50 % po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana.

Satelitní skupiny 20 exponovaných zvířat každého pohlaví a příslušných 10 kontrolních zvířat každého pohlaví použitých pro testování chronické toxicity by měly v experimentu setrvat alespoň 12 měsíců. u těchto zvířat by měla být plánována pitva za účelem zjištění, zda se u nich nezávisle na procesu stárnutí vyvinuly patologické projevy.

Postup

Pozorování

Denní pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování.

U zvířat exponované satelitní skupiny (nebo skupin) se provádí v přiměřených intervalech klinické vyšetření.

Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Zaznamenávají se klinické příznaky včetně neurologických a očních změn u všech zvířat a dále případy uhynutí. Zvláštní pozornost se věnuje vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného nebo hmatatelného tumoru se zaznamenává.

Měření spotřeby potravy (a vody, je-li zkoušená látka podávána v pitné vodě) se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně ve tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období.

Klinická vyšetření

Hematologie

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček nebo jiné ukazatele srážlivosti) se provádějí po třech měsících, šesti měsících a poté přibližně v šestiměsíčních intervalech a po ukončení na vzorcích krve shromážděných od 10 potkanů z každého pohlaví z každé skupiny. Vzorky se ve všech intervalech odeberou pokud možno od stejných potkanů.

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studie, provede se vyšetření diferenciálního obrazu bílých krvinek postižených zvířat.

Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje u skupiny (skupin) s nejbližší nižší dávkou pouze tehdy, jsou-li mezi skupinou s nejvyšší dávkou a kontrolními skupinami významné odchylky nebo pokud to indikují patologické nálezy.

Analýza moči

Pro analýzu moči se shromažďují vzorky od 10 potkanů každého pohlaví ze všech skupin, pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologická vyšetření. Následující stanovení se provádějí buď na vzorcích jednotlivých zvířat, nebo na směsném vzorku pro pohlaví/skupinu hlodavců:

- vzhled moči: objem a hustota u jednotlivých zvířat,
- bílkoviny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semikvantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semikvantitativně).

Biochemické vyšetření

V přibližně šestiměsíčních intervalech a po ukončení se odeberou krevní vzorky pro biochemická měření od všech nehlodavců a od 10 potkanů obojího pohlaví z každé skupiny, pokud možno od týchž potkanů v každém intervalu. Kromě toho se před zkouškou odeberou vzorky od nehlodavců. Z těchto vzorků se připraví plasma a provedou se následující zkoušky:

- celková koncentrace bílkovin,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita basické fosfatasy, aktivita glutamát-pyruvát-transaminasy ⁽¹⁾, glutamát-oxalacetát-transaminasy ⁽²⁾, gama-glutamyltranspeptidasy, ornitindekarboxylasy,
- metabolismus glycidů, např. glukosa v krvi na lačno,
- testy na funkci ledvin, např. dusík močoviny v krvi.

⁽¹⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

Pitva

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agónii, se provede kompletní pitva. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné tumory nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovávají. Měl by být proveden pokus porovnat anatomicko-patologické změny s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně se uchovávají pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozek⁽¹⁾ (medula/pons, kůra mozku a mozečku), podvěsek mozkový, štítná žláza (včetně příštítných tělísek), thymus, plíce (včetně průdušnice), srdce, aorta, slinné žlázy, játra⁽¹⁾, slezina, ledviny⁽¹⁾, nadledviny⁽¹⁾, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, lymfatické uzliny, slinivka, gonády⁽¹⁾, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčné žlázy, kůže, svalovina, periferní nerv, mícha (krční, hrudní a bederní), sternum s kostní dřeví a stehenní kost (včetně kloubů) a oči.

Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. Ve speciálních studiích, jako jsou inhalační studie, se studuje celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, měly by být informace získané z těchto procedur k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou být patologovi významným vodítkem.

Histopatologická vyšetření

V části studie pro zkoušení chronické toxicity:

Provede se podrobné vyšetření všech uchovaných orgánů všech zvířat satelitní skupiny s vysokou dávkou a satelitní kontrolní skupiny. Pokud jsou v satelitní skupině exponované nejvyšší dávce nalezeny patologické změny způsobené látkou, vyšetří se histologicky cílové orgány všech ostatních zvířat z ostatních exponovaných satelitních skupin i ze všech exponovaných skupin části studie věnované karcinogenitě při jejím ukončení.

V části studie pro zkoušení karcinogenity:

- a) úplné histopatologické vyšetření orgánů a tkání se provede u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během zkoušky, u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u všech zvířat kontrolní skupiny;
- b) všechny tumory viditelné okem a léze, které by mohly být tumory, se mikroskopicky vyšetří u všech skupin ve všech orgánech;
- c) je-li významný rozdíl ve výskytu neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, provede se histopatologické vyšetření v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách;
- d) je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrolních skupin, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou;
- e) jsou-li ve skupině s vysokou dávkou důkazy o vyvolání toxických nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou odpověď, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících tumory nebo toxické účinky zjištěné během zkoušky, doba jejich zjištění a počet zvířat s tumory zjištěnými po utracení. 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,

⁽¹⁾ Tyto orgány odebrané 10 hlodavcům každého pohlaví se zváží.

- zkušební podmínky:
 - popis expozičního zařízení:
 - včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic aerosolů, klimatizačního systému, popis čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu;
 - údaje o expozici:
 - zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:
 - a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;
 - b) teplota a vlhkost vzduchu;
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení dělené objemem vzduchu);
 - d) druh vehikula, pokud bylo použito;
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
 - f) medián velikosti částic (podle možnosti);
- úroveň dávek (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
- výskyt tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování, včetně satelitních skupin,
- výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- oftalmologické nálezy,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků všech analýz moči),
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické zpracování výsledků a popis použitých metod,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 **Hodnocení a interpretace**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

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 estrus. 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*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.

Látka se podává sedm dní v týdnu.

*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 musí mít dostatečný počet zvířat, aby bylo zaručeno přibližně 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 F₁ od početí do odstavení.

Zkušební podmínky

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před vrhem se březí samice přemísť do oddělených vrhních nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

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.

Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg·kg⁻¹ 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.

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 F₁. 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 týměž 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. To může zahrnovat poskytnutí další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností nebo mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů nebo 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). Vrhů s méně než osmi potomky nelze standardizovat.

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 mrtvých 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.

Patologie

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. Uhybnulá mláďata nebo mláďata v agónii se vyšetří na defekty.

Histopatologická vyšetření

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné vajíčky, prostata, koagulační žláza, hypofýza 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.

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,
- pitevnické 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.

DVOUGENERAČNÍ 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 rodičovské generace (P) se podává zkoušená látka v době růstu a alespoň v průběhu 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 estrus. Zvířata jsou poté připuštěna. v době připuštění se zkušební látka podává zvířatům obou pohlaví, v době březosti a laktace pouze samicím. Po odstavení se látka podává zvířatům generace potomstva F_1 v průběhu jejich růstu až do dospělosti, v době páření a produkce generace F_2 až do doby odstavení generace F_2 . Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody*Příprava*

Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Nejméně pět dní před zkouškou jsou rodičovská zvířata (P) 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 o nich být známo, že nemají toxický účinek. Látka se podává sedm dní v týdnu.

Pokusná zvířata: výběr druhů

Upřednostňovanými druhy jsou potkan nebo myš.

Používají se zdravá zvířata generace P, 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 musí mít dostatečný počet zvířat, aby bylo zaručeno přibližně 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, mateřské chování, laktaci, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí do odstavení a vývoj jejich potomstva (F_2) do odstavení.

Zkušební podmínky

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před vrhem se březí samice přemísť do oddělených vrhnic nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

Úrovně dávek

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Používá-li se při aplikaci 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 podávání 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.

Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg·kg⁻¹ žádné důkazy o vlivu na reprodukční schopnost, není zkoušení při dalších úrovních dávek potřebné. Pokud předběžná studie prokáže, že vysoká dávka vyvolávající u matek jasné příznaky toxicity nemá nepříznivé účinky na plodnost, není zkoušení při dalších úrovních dávek potřebné.

Provedení zkoušky

Plán pokusu

Denní podávání samic 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 F₁. Může být nezbytné změnit plán dávkování podle dostupných znalostí o vlastnostech zkoušené látky, např. o indukci metabolismu a/nebo bioakumulaci.

Podávání zvířatům generace F₁ začíná po odstavení a končí jejich utrácením.

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 tímž 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. Vzhledem k vývoji spermiogeneze se zvířata generace F₁ nepoužívají pro připouštění až do věku 11 týdnů u myši a 13 týdnů u potkana. Za účelem produkce potomstva F₂ se pro připouštění zvířat generace F₁ náhodně vyberou jeden samec a jedna samice z každého vrhu a spárují se se zvířaty z jiného vrhu téže dávkové skupiny. Zvířata, která se nepoužijí, se utratí po odstavení.

Páry, u kterých nedojde k oplodnění, se vyšetří s cílem zjistit důvod neplodnosti. To může zahrnovat poskytnutí další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností nebo mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů nebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

Velikost vrhů

Zvířatům exponovaným ve studii fertility se ponechá možnost vrhat 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). Vrhů s méně než osmi potomky nelze standardizovat. Standardizace vrhů generace F_2 se provede obdobným způsobem.

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 týdně měří příjem potravy. Během březosti lze případně kontrolovat příjem potravy denně. Po vrhu a v průběhu laktace se měří příjem potravy ve stejný den, kdy se váží potomstvo. Samci a samice rodičovské generace (P a F_1) 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 mrtvých a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií.

Mrtvá mláďata a mláďata utracená ve 4. dnu se uchovávají 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.

Patologie

Pítva

Všechna dospělá zvířata generací P a F_1 se utratí, jakmile nejsou nezbytná pro posouzení účinků na reprodukci. Zvířata generace F_1 , která nebyla vybrána pro připouštění, a všechna zvířata generace F_2 se utratí po odstavení.

Po utracení nebo úmrtí během studie se všechna zvířata rodičovské generace (P a F_1) mikroskopicky vyšetří na strukturální abnormality anebo patologické změny, přičemž se zvláštní pozornost věnuje orgánům reprodukčního systému. Uhybnulá mláďata nebo mláďata v agónii se vyšetří na defekty.

Histopatologická vyšetření

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné vázky, koagulační žláza, prostata, hypofýsa a cílový orgán (cílové orgány) všech zvířat generace P a F_1 se uchovávají 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 všech kontrolních zvířat generace P a zvířat generace F_1 použitých pro připouštění a pokud možno u zvířat, která uhynula v průběhu studie. Orgány, které vykazovaly u těchto skupin zvířat abnormality, se vyšetří i u zvířat 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.

2. ÚDAJE

Zpracování výsledků

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, 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 zvířat do konce studie,
- tabulka s údaji o hmotnosti každého vrhu, průměrné hmotnosti mláďat a individuální hmotností 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,
- tělesná hmotnost zvířat generace P a F₁ vybraných pro připouštění,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech mikroskopických 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.

STUDIE TOXIKOKINETIKY

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 vhodným způsobem. v závislosti na účelu studie je možné látku podávat v jednorázové dávce nebo v opakovaných dávkách po stanovenou dobu jedné nebo několika skupinám pokusných zvířat. Látka a/nebo její metabolity se poté podle typu studie stanoví v tělních tekutinách, tkáních a/nebo v exkretech.

Studie mohou být prováděny s „neznačenou“ nebo „značenou“ formou zkoušené látky. Jestliže se použije značená látka, musí být značena tak, aby se získalo co nejvíce informací o osudu sloučeniny v organismu.

1.5 Kritéria jakosti

Nejsou stanovena.

1.6 Popis zkušební metody*Příprava*

Zdravá mladá dospělá zvířata se nejméně pět dnů před zkouškou aklimatizují na laboratorní podmínky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat, která se přiřadí do experimentálních skupin. Pro řešení speciálních otázek mohou být použita velmi mladá, březí nebo premedikovaná zvířata.

*Zkušební podmínky**Pokusná zvířata*

Toxikokinetické studie mohou být prováděny na jednom nebo více vhodných živočišných druzích; měly by být prováděny na druzích používaných nebo určených pro užití v jiných toxikologických studiích s toutéž zkoušenou látkou. Použijí-li se ve zkoušce hlodavci, neměly by odchylky hmotnosti překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Počet a pohlaví

Pro studium absorpce a vylučování se zpočátku pro každou úroveň dávky použije skupina čtyř zvířat. Výběr podle pohlaví se nepožaduje, za určitých podmínek však může být potřeba studovat obě pohlaví. Existuje-li mezi pohlavími rozdíl v odezvě, použijí se čtyři zvířata každého pohlaví. v případě studií na nehlodavcích může být použito méně zvířat.

Při studiu distribuce v tkáni se při určení počáteční velikosti skupiny zohlední počet zvířat, která budou utracena v jednotlivých časových bodech, a počet zkoumaných časových bodů.

Při studiu metabolismu se velikost skupiny upraví podle potřeb studie.

U studií s více dávkami a u studií s více časovými body se při určení velikosti skupiny zohlední počet časových bodů a plánovaných utracení; skupina však nesmí být menší než 2 zvířata. Velikost skupiny zvířat by měla být dostatečná k tomu, aby poskytla charakteristiky fáze retence, rovnovážného stavu a deplece (podle potřeby) u zkoušené látky a/nebo metabolitů.

Úrovně dávek

V případě jednorázového podání se použijí nejméně 2 různé úrovně dávek zkoušené látky. Použije se nízká dávka látky, po které nejsou pozorovány žádné toxické účinky, a vysoká dávka, po které by mohly být nalezeny změny v toxikokinetických parametrech nebo která vyvolává toxické účinky.

V případě opakovaného podání dávky většinou stačí nízká dávka; za určitých podmínek však může být nezbytné také podání vysoké dávky.

Způsob podávání

U toxikokinetické studie se použije stejný způsob podávání, a je-li to vhodné, také stejné vehikulum, jaké se používají v jiných toxikologických studiích. Zkoušená látka se obvykle podává orálně sondou nebo v potravě, aplikuje se na kůži nebo se podává inhalačně po stanovenou dobu skupině pokusných zvířat. Intravenózní podání zkoušené látky může být užitečné pro stanovení relativní rychlosti vstřebávání při jiném způsobu aplikace. Kromě toho mohou být krátce po intravenózní aplikaci získány důležité informace o distribuci látky v organismu.

Je třeba zvážit možnou interferenci vehikula a zkoušené látky. Je třeba také věnovat pozornost rozdílům ve vstřebávání, podává-li se zkoušená látka sondou nebo v potravě, a potřebě přesného stanovení dávky, zejména při podávání zkoušené látky v potravě.

Doba pozorování

Všechna zvířata se pozorují denně a příznaky toxicity i další relevantní klinická pozorování se zaznamenávají spolu s údaji o jejich nástupu, závažnosti a trvání.

Postup

Po zvážení pokusných zvířat se vhodným způsobem podá zkoušená látka. Podle potřeby lze zvířata před podáním zkoušené látky nechat vyhladovět.

Absorpce

Rychlost a rozsah absorpce podávané látky lze stanovit různými metodami, a to s referenční skupinou nebo bez ní⁽¹⁾, například:

- stanovením množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v exkretech, např. v moči, žluči, stolici, vydechovaném vzduchu, a také jejich zbytků v karkasu,
- porovnáním biologické odezvy (např. studií akutní toxicity) exponované a kontrolní a/nebo referenční skupiny,
- porovnáním množství látky a/nebo jejích metabolitů vylučovaných ledvinami u exponované a/nebo referenční skupiny,
- stanovením plochy pod křivkou závislosti koncentrací zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v plazmě na čase a porovnáním s údaji získanými u referenční skupiny.

⁽¹⁾ V této metodě je referenční skupinou skupina, které je zkoušená látka podávána jiným způsobem, který zajišťuje úplnou biologickou dostupnost dávky.

Distribuce

V současné době jsou pro analýzu distribučního schématu k dispozici dva přístupy, které mohou být použity jednotlivě nebo společně:

- užitečné kvalitativní informace lze získat při použití celotělové autoradiografie,
- kvantitativní informace poskytuje stanovení koncentrací a množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních a orgánech získaných utrácením zvířat v různých časových intervalech po zahájení expozice.

Vylučování

Při studiu vylučování se sbírá moč, stolice, vydechovaný vzduch, v určitých případech žluč. Množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů se v těchto exkretech stanovuje několikrát po podání látky, a to buď až do vyloučení 95 % podané dávky, nebo do uplynutí 7 dnů od počátku vylučování, podle toho, k čemu dojde dříve.

Ve speciálních případech může být také nezbytné sledovat vylučování zkoušené látky v mléce v době laktace zkušebních zvířat.

Metabolismus

Za účelem stanovení rozsahu a schématu metabolismu se biologické vzorky analyzují vhodnými technikami. Měla by být objasněna struktura metabolitů a mělo by být navrženo odpovídající schéma metabolismu, je-li třeba odpovědět na otázky z předcházejících toxikologických studií. Pro získání informací o metabolismu může být užitečné provedení studií *in vitro*.

Další informace o vztahu mezi metabolismem a toxicitou lze získat z biochemických studií, např. ze studia účinků látky na enzymy metabolického systému, ze sledování poklesu endogenních neproteinových sloučenin obsahujících -SH skupiny a z vazby látky na makromolekuly.

2. ÚDAJE

V závislosti na typu prováděné studie se údaje shrnou do tabulky a podle potřeby doplní grafickou prezentací. Pro každou experimentální skupinu se uvedou závislosti průměrů a statistických odchylek naměřených hodnot na čase, dávce, tkáních a orgánech (pokud je to relevantní). Stupeň vstřebání a množství a rychlost vylučování se stanoví vhodnými metodami. Jsou-li prováděny studie metabolismu, uvede se struktura identifikovaných metabolitů a možné schéma metabolismu.

3. ZPRÁVY

3.1 Protokol o zkoušce

Podle typu prováděné studie musí protokol o zkoušce obsahovat pokud možno tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,
- charakteristika značené látky, je-li použita,
- úroveň dávek a intervaly podávání,
- způsob (způsoby) podávání a všechna použitá vehikula,
- pozorované toxické a jiné účinky,
- metody stanovení zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v biologickém materiálu včetně vydechovaného vzduchu,
- tabulky výsledků rozdělených podle pohlaví, dávky, stravy, času, tkání a orgánů,

- údaje o rozsahu vstřebávání a vylučování v závislosti na čase,
- metody použité pro popis a identifikaci metabolitů v biologickém materiálu,
- metody použité pro biochemická stanovení týkající se metabolismu,
- navrhované schéma metabolismu,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 **Hodnocení a interpretace**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

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

Žádné.

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 185-14C s *nonsense* mutacemi (ochre) *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* a *trp 5-48*, které jsou vratné působením mutagenů vyvolávajících záměnu bází, indukujících mutace ve specifickém místě nebo ochre-supresorové mutace. 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 D₇, 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 je 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 aktivčního 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 D₇. 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.

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: $1-5 \times 10^7$ buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 h 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: úroveň 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 honocení údajů,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 **Hodnocení a interpretace**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

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 rekombinací 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 nerekiproční 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 revertantů 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 JD_1 (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.

*Zkušební podmínky**Zkušební kmeny*

Nejpoužívanějšími kmeny jsou diploidní kmeny D_4 , D_5 , D_7 a JD_1 . 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 h. 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 vytvořit odpovídající pigmentované kolonie.

Četnost spontánní mitotické rekombinace

Použijí se subkultury s četností spontánní mitotické rekombinace v obvyklém přijatelném rozmezí.

Počet misek

Pro stanovení počtu prototrofních buněk vznikajících mitotickou genovou konverzí a pro stanovení životaschopnosti buněk se použije nejméně tři misek na jednu koncentraci. Pro stanovení recesivní homozygosity 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. $1-5 \times 10^7$ buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 h 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 pokus pozitivní, potvrdí se dalším 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.

3.2 Hodnocení a interpretace

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE 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**

Žádné.

1.4 **Podstata zkušební metody**

Buněčné kultury savčích buněk mohou být použity k detekci mutací indukovaných chemickými látkami. Nejčastěji používanými buněčnými liniemi jsou buňky lymfomu myši L5178Y a linie CHO a V-79 buněk křečka čínského. v těchto buněčných liniích jsou nejčastěji užívanými systémy detekce mutací v lokusech thymidinkinasy (TK), hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT) (1) a Na⁺/K⁺ ATPasy. Systémy TK a HPRT detekují mutace párů bází, posunové mutace a malé delece; systém Na⁺/K⁺ detekuje pouze mutace párů bází.

Buňky, které v důsledku mutace TK⁺→TK neobsahují thymidinkinasu (TK), jsou rezistentní k bromodeoxyuridinu (BrdU), fluorodeoxyuridinu (FdU) nebo trifluorothymidinu (TFT), protože tyto antimetabolity nejsou zabudovány do buněčných nukleotidů „salvage“-enzymatickým systémem thymidinkinasy; nukleotidy potřebné pro buněčný metabolismus jsou získávány výhradně syntézou *de novo*. v přítomnosti thymidinkinasy jsou BrdU, FdU nebo TFT zabudovány do nukleotidů, což vede k inhibici buněčného metabolismu a cytotoxickému účinku. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti BrdU, FdU nebo TFT, zatímco normální buňky, které obsahují thymidinkinasu, tuto schopnost nemají. Podobně lze u buněk s deficientním HPRT provést selekci prostřednictvím rezistence k 8-azaguaninu (AG) nebo 6-thioguaninu (TG). u buněk s alterací Na⁺/K⁺ ATPasy lze provést selekci prostřednictvím rezistence k ouabainu.

Cytotoxicita se zjistí měřením účinku zkoušeného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (účinnost klonování) nebo stanovením rychlosti růstu kultur. 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 životaschopnost. Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočte z počtu mutantních kolonií korigovaného počtem přežívajících buněk.

1.5 **Kritéria jakosti**

Nejsou stanovena.

1.6 **Popis zkušební metody**

Příprava

Buňky

Pro použití v této zkoušce jsou k dispozici různé typy buněčných linií. Patří mezi ně subklony buněk L5178Y, CHO nebo V-79 s prokázanou citlivostí k chemickým mutagenům, vysokou účinností klonování a nízkou četností spontánních mutací. u buněk může být pravidelně kontrolována stabilita karyotypu a měly by být kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty. Ostatní typy buněk mohou být použity v případě, že oprávněnost jejich použití ke zkoušení chemicky indukované genové mutace je plně prokázána.

(1) Dříve HGPRT.

Médium

Použijí se vhodná kultivační média a inkubační podmínky (teplota, použité kultivační nádoby, koncentrace CO₂ a vlhkost). Média a séra by měla být zvolena podle selekčních systémů a typů buněk použitých při zkoušce.

Zkoušená látka

Před exponováním buněk se zkoušené látky mohou rozpustit nebo suspendovat v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk nebo rychlost růstu.

Metabolická aktivace

Buňky se exponují zkoušené chemické látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného 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.

Zkušební podmínky

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly, jimiž je jak přímo působící chemická látka, tak látka vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použijí negativní kontroly (s vehikulem).

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

— přímo působící látky:

- ethyl-methansulfonát,
- hycanthon,

— nepřímo působící látky (vyžadující metabolickou aktivaci):

- N-(fluoren-2-yl)acetamid,
- 7,12-dimethylbenzoanthracen,
- N-nitrosodimethylamin.

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 vede 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 za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Postup

Počet buněk použitých pro jednu kulturu musí být odvozen od četnosti spontánních mutací; obvykle se používá počet živých buněk, který je 10násobkem převrácené hodnoty četnosti spontánních mutací.

Expozice by měla trvat vhodnou dobu, obvykle je účinná doba od dvou do pěti hodin. Buňky bez dostatečné vlastní metabolické aktivity musí být exponovány zkoušené látce jak s vhodným metabolickým aktivačním systémem, tak bez něho. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují, aby mohla být zhodnocena jejich životaschopnost a projev mutačního fenotypu.

Ke konci fáze exprese, která by měla být dostatečně dlouhá k vyvolání optimální fenotypické exprese indukovaných mutací, se buňky kultivují v médiu se selektivními látkami a bez nich za účelem stanovení počtu mutací a životaschopnosti buněk.

Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě. Jednotlivě pro každou misku se u zkoušené látky a kontrol uvede počet mutací a počet přežívajících buněk. Rovněž se uvede průměrný počet kolonií na misku a směrodatná odchylka. Četnost mutací se vyjádří jako počet mutantů na počet přežívajících buněk. Přežívání buněk a účinnosti klonování se vyjádří v procentech hodnoty kontrolní skupiny.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY

3.1. Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí, pokud možno, obsahovat tyto informace:

- použitá buněčná linie, počet buněčných kultur, metody udržování buněčných kultur,
- zkušební podmínky: složení média, koncentrace CO₂, koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, inkubační teplota, inkubační doba, délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média), délka expozice, hustota buněk během expozice, typ použitého savčího metabolického aktivčního systému, pozitivní a negativní kontroly, použité selekční činidlo,
- zdůvodnění výběru koncentrací,
- metody použité k počítání životaschopných a mutantních 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.

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**

Žádné.

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 ($^3\text{H-TdR}$) do DNA savčích buněk, které nejsou v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace $^3\text{H-TdR}$ 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, je-li to vědecky zdůvodnitelné) pro metodu stanovení UDS pomocí LSC.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí souběžně 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 aktivčního 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 CO₂, teplota a vlhkost. u zavedených buněčných linií musí být pravidelně kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty.

Metabolická aktivace

U primárních kultur hepatocytů se nepoužívá metabolický aktivční systém. Zavedené buněčné linie a lymfocyty se exponují zkoušené látce za přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivčního 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.

Expozice kultur zkoušené látce

Primární hepatocyty potkana

Čerstvě izolované hepatocyty potkana se vhodnou dobu exponují zkoušené látce v médiu obsahujícím ³H-TdR. Po ukončení expozice se médium z buněk odstraní, buňky se promyjí, fixují a vysuší. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulze (může být použit 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 ³H-TdR. Doba expozice je závislá na druhu zkoušené látky, na aktivitě metabolického systému a na typu buněk. k zachycení vrcholu UDS je třeba ³H-TdR přidat současně se zkoušenou látkou nebo několik minut po expozici. Výběr mezi těmito postupy závisí na možné interakci mezi zkoušenou látkou a ³H-TdR. k rozlišení UDS od semikonzervativní replikace DNA se používá médium deficientní na arginin, nízký obsah séra nebo hydroxymočovina v kultivačním médiu, což působí inhibiči 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 popsáním pro autoradiografii. Na konci kultivace se DNA extrahuje z buněk a stanoví se celkový obsah DNA a rozsah zabudování ³H-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 $^3\text{H-TdR}$ 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.

Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

2.1 Vyhodnocení autoradiografie

Rozsah zabudování $^3\text{H-TdR}$ do cytoplazmy a počet zrn nalezených mimo buněčné jádro se zaznamenají odděleně.

Distribuci rozsahu zabudování $^3\text{H-TdR}$ do cytoplazmy a počet zrn v jádře lze popsat střední hodnotou, mediánem a modem.

2.2 Vyhodnocení LSC

U LSC se rozsah zabudování $^3\text{H-TdR}$ 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, 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.

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 vřetenka (např. kolchicinem), aby se akumulovaly buňky v C-metafázi mitózy; kultury se sklídí a připraví se preparáty pro analýzu chromozomů.

1.5 **Kritéria jakosti**

Nejsou stanovena.

1.6 **Popis zkušební metody***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 CO₂ 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.
- 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.

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:
 - cyklofosamid.

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.

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 suspenzní kultury. Lidské lymfocytární kultury se připraví vhodnými postupy z heparinizované krve a inkubují při teplotě 37 °C.

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 sklídí 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.

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 CO₂, 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, 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.

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 u *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 inverzí 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.

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 stádiu, na časně 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.

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 stádiu 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, je-li 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.

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 spojenými s maligní transformací *in vivo*. Často používanými buňkami jsou C3H10T $\frac{1}{2}$, 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 látky 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**Buňky*

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.

Médium

Použitá média a experimentální podmínky musí být vhodné pro použitou zkoušku na transformace.

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 se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivacího 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.

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 za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

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.

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 látky 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 látky a páření s neexponovaným dosud nepřípuštěnými 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.

*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. Proveďte 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 souběžně 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⁻¹).

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⁻¹ při jednorázovém podávání nebo v dávce 1 g·kg⁻¹ 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 nepřipouštěnými 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 spermii ve vagině nebo přítomností vaginální zátky.

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 a počtu 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 časně 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, 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.

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA SAVČÍCH ZÁRODEČNÝCH BUNĚK *IN VIVO***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

Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují strukturální chromosomové aberace ve spermatogoniích. Je založena na analýze mitóz spermatogonií na chromatidové a chromosomové typy aberací.

V metodě se používají preparáty z varlat savců, kteří byli vhodným způsobem exponováni zkoušené látce a usmrceni v různých intervalech. Před usmrcením se zvířatům podá inhibitor dělicího vřeténka, např. kolchicin, aby došlo k nahromadění buněk ve stádiu metafáze mitózy (C-metafáze). Zhotoví se mikroskopické preparáty chromosomů usušené na vzduchu, obarví se a analyzují se pod mikroskopem.

Analýza spermatocytů v diakinézi (metafáze I) na mnohočetné translokace po expozici kmenových buněk spermatogonií může poskytnout další užitečné informace.

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 vhodném vehikulu. 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

Zkoušená látka se obvykle podává pouze jednou. Na základě toxikologických informací lze podávat látku opakovaně. Opakované podávání však může být použito pouze tehdy, nevyvolává-li zkoušená látka větší cytotoxické účinky v diferencujících se spermatogoniích.

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby podávání.

Pokusná zvířata

Nejčastěji se používá myš a křeček čínský. Mohou být použity také jiné savčí druhy.

Použijí se pohlavně dospělí samci, kteří se náhodně rozdělí do exponovaných a kontrolních skupin.

Počet zvířat

Pro exponovanou i kontrolní skupinu se použije nejméně pět samců.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí souběžné pozitivní kontroly a negativní kontroly (s vehikulem).

Látky pro pozitivní kontroly se použijí ve vhodných nízkých dávkách (např. mitomycin C intraperitoneálně 0,3 mg·kg⁻¹) k prokázání citlivosti zkoušky.

Úrovně dávek

Použije se jedna dávka zkoušené látky, přičemž tato dávka má být maximální tolerovanou dávkou nebo dávkou vyvolávající určité známky cytotoxicity. Způsobuje-li tato dávka vysokou úmrtnost buněk, použije se doplňující dávka s nižší cytotoxicitou. Má-li být stanovena závislost dávka/odezva, použijí se nejméně tři dávky (např. k potvrzení slabě pozitivní odezvy). u netoxických látek se použije nejvyšší dosažitelná koncentrace jak pro jednorázovou, tak pro opakovanou aplikaci.

Postup

Zvířata se obvykle exponují zkoušené látce pouze jednou. Ve skupině s nejvyšší dávkou se odeberou vzorky nejméně ve třech intervalech po expozici. Prostřední odběr se provede po 24 h. Vzhledem k tomu, že zkoušená látka může ovlivnit kinetiku buněčného cyklu, provede se jeden dřívější a jeden pozdější odběr ve vhodné době v rozmezí od 6 do 48 hodin. u doplňujících úrovní dávky se vzorky odeberou v nejcitlivějším okamžiku, nebo po 24 hodin po aplikaci, pokud není znám.

Jinou možností je opakované podávání; zvířata se v takovém případě usmrtí 24 hodin po poslední aplikaci. Další odběry mohou být provedeny v rozmezí od 6 do 24 hodin.

Příprava preparátů z varlat

Před analýzou mitóz spermatogonií se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka inhibitoru mitózy, např. kolchicinu. Po vhodné době se zvířata usmrtí. u myši je tento interval tři až pět hodin, u křečka čínského může být potřeba více než pět hodin.

Použije se technika preparátů sušených na vzduchu. u některých druhů může být nezbytná úprava standardního postupu. Připraví se buněčná suspence, hypotonizuje se a fixuje. Buňky se rozprostřou na sklíčko a obarví. Preparáty se před analýzou opatří kódem.

Analýza

Nejméně 100 dobře rozprostřených metafází s plným počtem centromer se analyzuje na strukturální chromosomové aberace. Kromě toho lze za účelem stanovení možného cytotoxického účinku vypočítat poměr mitóz spermatogonií k prvním a druhým meiotickým metafázím ve vzorku celkem 100 dělicích se buněk na zvíře.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě. Všechny typy aberací se pro každé exponované a kontrolní zvíře uvedou samostatně. Uvede se celkový počet analyzovaných buněk a celkový počet aberantních buněk na skupinu. Pro každý parametr se uvede střední hodnota a směrodatná odchylka. Pokud to bylo zjišťováno, uvede se v tabulkové formě poměr mitóz spermatogonií k prvním a druhým meiotickým metafázím pro experimentální a kontrolní skupinu.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 **Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- druh a kmen samců, věk a hmotnost samců,
- počet zvířat v každé experimentální a kontrolní skupině,
- zkušební podmínky, podrobný popis expozice, úrovně dávek, rozpouštědla, použitý inhibitor dělicího vřeténka,
- počet analyzovaných buněk na zvíře v každé skupině,
- pro každé exponované a kontrolní zvíře: typy a počty aberací,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 **Hodnocení a interpretace**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

SPOT TEST NA MYŠÍCH

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

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 rozpouštědlem. *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}/c^{ch} ; 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 C57 BL (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).

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 dávkou.

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 slabín a uprostřed čela, u nichž se předpokládá, že vznikají v důsledku chybné diferenciaci (MDS);
- c) pigmentované a bílé skvrny náhodně rozmístěné v srsti, u nichž se předpokládá, že jsou výsledkem somatických mutací (RS).

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 vztahované 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.

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 myši 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 XO 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 XO 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.

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 pozitivních kontrol 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 chemických látek se použije nejvyšší dosažitelná dávka.

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 myši.

Pozorování velikosti vrhu: samci generace F_1 určené 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 XO 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.

Analýza 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 stádiu 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.

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 diakinézy-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 generace F_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.

3.2 Hodnocení a interpretace

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY**OBECNÝ ÚVOD: ČÁST C**

Níže popsané zkušební metody slouží ke stanovení některých ekotoxických vlastností uvedených v příloze VIII směrnice Rady 79/831/EHS. Oznamovatelé by si měli uvědomit, že text neobsahuje metody pro stanovení následujících vlastností, jejichž stanovení se podle přílohy VIII požaduje na stupni 1:

- dlouhodobé toxicity pro *Daphnia magna*,
- toxicity pro vyšší rostliny,
- dlouhodobé toxicity pro ryby,
- akumulace v určitých druzích.

Vhodné metody pro stanovení těchto vlastností budou ve svém konečném znění zveřejněny ve formě přizpůsobení směrnice technickému pokroku. Do té doby by měli oznamovatelé používat vhodné mezinárodně uznávané metody, které předloží příslušnému orgánu.

ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU ŘAS

1. METODA**1.1 Úvod**

Účelem této zkoušky je stanovit účinky látky na růst jednobuněčných zelených řas. Relativně krátkodobými zkouškami lze posoudit účinky na několik generací řas. Tato metoda může být upravena pro použití s několika druhy jednobuněčných řas, přičemž musí být v protokolu o zkoušce uveden popis použité metody.

Použití metody je nejsnadnější v případě látek rozpustných ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně zůstávají ve vodě.

U látek s omezenou rozpustností ve zkušebním médiu nebude pravděpodobně možné kvantitativně stanovit EC_{50} (viz definice níže).

Metodu lze použít pro látky, které přímo neovlivňují měření růstu řas.

Před provedením zkoušky je užitečné ověřit tyto informace:

- rozpustnost látky ve vodě,
- tlak par,
- strukturní vzorec,
- čistota látky,
- chemická stabilita ve vodě a na světle,
- metody analýzy pro kvantitativní stanovení látky ve vodě,
- hodnota pK_a ,
- rozdělovací koeficient n-oktanol/voda,
- výsledky zkoušky „snadné“ biologické rozložitelnosti.

1.2 Definice a jednotky

Koncentrace buněk: počet buněk na jeden mililitr.

Růst: zvyšování koncentrace buněk během doby trvání zkoušky.

Růstová rychlost: nárůst koncentrace buněk za jednotku času.

EC_{50} : v této metodě jde o koncentraci zkoušené látky, která má za následek 50 % snížení růstu nebo růstové rychlosti vzhledem ke kontrole.

NOEC (*no observed effect concentration*): v této metodě jde o nejvyšší zkušební koncentraci, při níž není pozorováno žádné významné snížení růstu nebo růstové rychlosti vzhledem ke kontrole.

1.3 Referenční látky

Zkouška s referenční látkou může sloužit jako indikátor nevyhovujících zkušebních podmínek. Při použití referenční látky musí být výsledky uvedeny do protokolu o zkoušce. Jako referenční látka může být použit dichroman draselný.

1.4 Podstata zkušební metody

Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několik generací vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkoušené látky. Stanoví se snížení růstu za stanovené období ve srovnání s kontrolní kulturou.

1.5 **Kritéria jakosti**1.5.1 *Kritéria validity zkoušky*

Koncentrace buněk v kontrolních kulturách by se měla za tři dny zvýšit alespoň 16krát.

Zabudování zkoušené látky z vody do biomasy řas není nevyhnutelně důvodem pro neplatnost zkoušky.

1.6 **Popis zkušebního postupu**1.6.1 *Příprava*1.6.1.1 *Přístroje a materiál*

— Běžné laboratorní vybavení.

— Kultivační baňky o vhodném objemu (např. Erlenmeyerovy baňky na 250 ml jsou vhodné v případě zkušební roztoku o objemu 100 ml).

— *Kultivační zařízení*: místnost nebo komora, v níž lze udržovat teplotu v rozsahu 21–25 °C ±2 °C a stálé rovnoměrné osvětlení světlem o vlnové délce od 400 do 700 nm. (Doporučuje se tok fotonů 0,72·10²⁰ m⁻²·s⁻¹ s tolerancí ±20 %. Tento tok fotonů se rovná světelné intenzitě 120 μE·m⁻²·s⁻¹ a lze ho dosáhnout univerzálními bílými zářivkami (teplota chromatičnosti přibližně 4 200 K) poskytujícími přibližně 8 000 lx, měřeno sférickým kolektorem).

— Zařízení pro stanovení koncentrace buněk; např. elektronický počítač částic, mikroskop s počítací komůrkou, fluorimetr, spektrofotometr, kolorimetr (*Poznámka*: mají-li být při nízkých koncentracích buněk získány při použití spektrofotometru použitelné výsledky, je nezbytné použít kyvety s optickou dráhou nejméně 4 cm).

1.6.1.2 *Médium pro kultivaci řas*

Je doporučeno toto médium:

NH ₄ Cl:	15	mg·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O:	12	mg·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	18	mg·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	15	mg·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	1,6	mg·l ⁻¹
FeCl ₃ ·6H ₂ O:	0,08	mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O:	0,1	mg·l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,185	mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O:	0,415	mg·l ⁻¹
ZnCl ₂ :	3×10 ⁻³	mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O:	1,5×10 ⁻³	mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O:	10 ⁻⁵	mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O:	7×10 ⁻³	mg·l ⁻¹
NaHCO ₃ :	50	mg·l ⁻¹

Po provzdušnění a ustálení by mělo mít médium hodnotu pH přibližně 8.

Použití jiného média není tímto doporučením vyloučeno za předpokladu, že jsou dodrženy tyto mezní hodnoty nezbytných složek:

P:	≤ 0,7 mg·l ⁻¹
N:	≤ 10 mg·l ⁻¹
chelatační činidla:	≤ 10 ⁻³ mmol·l ⁻¹
tvrdost (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol·l ⁻¹

Doporučené médium a médium uvedené v literatuře (1) tyto podmínky splňují.

1.6.1.3 *Zkušební organismy**Výběr druhů*

Doporučuje se použít rychle rostoucí druhy zelených řas vhodné pro kultivaci a zkoušení. Za vhodné se považují tyto druhy:

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Použití jiného druhu řas musí být uvedeno ve zprávě.

1.6.1.4 Plán zkoušky

Počáteční koncentrace buněk

Doporučuje se, aby byla počáteční koncentrace buněk řasy *Selenastrum capricornutum* a řasy *Scenedesmus subspicatus* ve zkušebních kulturách přibližně 10^4 buněk v ml. Použije-li se jiný druh řasy, měla by být biomasa srovnatelná.

Koncentrace zkoušené látky

Rozsah koncentrací, ve kterém lze očekávat účinky, se stanoví z výsledků orientačních zkoušek. Pro zkoušku se zvolí geometrická řada nejméně pěti koncentrací. Nejnižší zkoušená koncentrace by neměla vykazovat žádný pozorovatelný účinek na růst řas. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla omezit růst ve srovnání s kontrolní zkouškou nejméně o 50 %, nejlépe by měla růst zcela zastavit.

Opakování a kontroly

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací a v ideálním případě dvojnásobek kontrol. Je-li pro to důvod, může být plán zkoušky upraven tak, že se použije více koncentračních úrovní a sníží se počet opakování zkoušky s každou koncentrací.

Použije-li se k rozpuštění zkoušené látky vehikulum, zařadí se do plánu zkoušky další kontroly obsahující vehikulum v nejvyšší koncentraci použité ve zkušební kultuře.

1.6.2 Provedení zkoušky

Tento oddíl obsahuje pokyny pro zkoušení snadno rozpustných látek, špatně rozpustných látek a těkavých látek.

1.6.2.1 Zkoušení snadno rozpustných látek

Zkušební kultury o požadované koncentraci zkoušené látky a požadovaném množství inokula řas se připraví zředěním alikvotních podílů zásobního roztoku zkoušené látky a suspence řas filtrovaným kultivačním médiem řas.

Kultivační baňky se protřepou a umístí do kultivačního zařízení. Během zkoušky je nezbytné udržovat buňky v suspensi, aby se usnadnila výměna CO_2 . Toho lze dosáhnout jeho protřepáváním, mícháním nebo provzdušňováním. Kultury se udržují při teplotě 21–25 °C udržované s přesností na ± 2 °C.

Koncentrace buněk v každé baňce se stanoví nejméně po 24, 48 a 72 hodinách po zahájení zkoušky. Filtrované médium pro kultivaci řas slouží ke stanovení pozadí při použití počítací částic nebo jako slepý pokus při použití spektrofotometru.

pH se měří na začátku zkoušky a po 72 hodinách.

Hodnota pH roztoku by se neměla během zkoušky změnit víc než o 1.

1.6.2.2 Zkoušení látek s omezenou rozpustností ve vodě

Jestliže je rozpustnost zkoušené látky stejného řádu jako nejvyšší koncentrace použitá ve zkoušce, je třeba pro přípravu zkoušených roztoků pouze nepatrně pozměnit výše popsany postup. Jako zásobní roztok zkoušené látky může sloužit nasycený roztok. Jinou možností je dosáhnout požadované koncentrace rozpuštěním zkoušené látky v médiu pro kultivaci řas před přidáním suspence řas.

Zásobní roztoky látek s nízkou rozpustností ve vodě mohou být připraveny mechanickou dispergací nebo použitím vehikul s nízkou toxicitou pro řasy, např. použitím organických rozpouštědel, emulgátorů a dispergátorů. Je-li použito vehikulum, neměla by jeho koncentrace překročit $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a musí být nasazeny další kontroly obsahující vehikulum v nejvyšší použité koncentraci.

1.6.2.3 Zkoušení těkavých látek

V současné době neexistuje obecně přijatý způsob zkoušení těkavých látek. Je-li o látce známo, že se snadno vypařuje, mohou být použity uzavřené kultivační nádoby se zvětšeným mrtvým objemem. Byly navrženy varianty této metody (1).

Měly by být učiněny pokusy stanovit množství látky, které v roztoku zůstalo; při interpretaci výsledků zkoušek s těkavými látkami v uzavřených systémech je doporučeno postupovat mimořádně opatrně.

2. ÚDAJE a VYHODNOCENÍ

Naměřené koncentrace buněk ve zkušebních kulturách a v kontrolách se spolu s koncentracemi zkoušené látky a dobami měření shrnou do tabulky. Střední hodnota koncentrace buněk pro každou zkušební koncentraci a pro kontroly se vynese proti času a sestrojí se růstová křivka.

Vztah koncentrace/účinek se stanoví dvěma následujícími postupy.

2.1 Porovnání ploch pod růstovými křivkami

Plocha pod růstovými křivkami se vypočte podle tohoto vzorce:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kde

A = plocha,

N_0 = počet buněk v ml v čase t_0 ,

N_1 = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_1 ,

N_n = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_n ,

t_1 = doba prvního měření od počátku zkoušky,

t_n = doba n -tého měření od počátku zkoušky.

Potlačení růstu buněk vyjádřené v % (I_A) se pro každou koncentraci zkoušené látky vypočte jako rozdíl plochy pod kontrolní růstovou křivkou (A_c) a plochy pod růstovou křivkou při dané koncentraci zkoušené látky (A_t):

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Hodnoty I_A se vynesou na semilogaritmický nebo na pravděpodobnostní semilogaritmický papír proti odpovídajícím koncentracím. Vynesou-li se body na pravděpodobnostní papír, proloží se body přímkou, a to ručně nebo při předpokladu lognormálního rozdělení hodnot regresním výpočtem.

Hodnota EC_{50} se získá z průsečíku (regresní) přímky rovnoběžné s vodorovnou osou vedené bodem $I_A = 50$ %. Pro jednoznačné označení této hodnoty v rámci této metody výpočtu se doporučuje použít symbol E_bC_{50} , v souladu s touto metodou, kdy se předpokládají měření po 24, 48 a 72 hodinách se použije symbol E_bC_{50} (0–72 hodin).

Ostatní hodnoty EC, např. E_bC_{10} , lze rovněž odečíst ze závislosti I_A na logaritmu koncentrace.

2.2 Porovnání růstových rychlostí

Průměrnou specifickou růstovou rychlost (μ) pro exponenciálně rostoucí kultury lze vypočítat podle rovnice:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Průměrnou specifickou růstovou rychlost lze také odvodit ze sklonu regresní přímky v závislosti $\ln N$ na čase.

Snížení střední specifické růstové rychlosti v procentech při všech koncentracích zkoušené látky ve srovnání s kontrolní hodnotou se vynesou proti logaritmu koncentrace. Hodnotu EC_{50} lze odečíst z výsledného grafu. Pro jednoznačné označení EC_{50} odvozené touto metodou se doporučuje použít symbol E_rC_{50} . Musí být uvedeny okamžiky měření, např. vztahuje-li se hodnota k času 24 a 48 hodin, označí se symbolem E_rC_{50} (24–48 hodin).

Poznámka: Ve výrazu pro specifickou růstovou rychlost vystupují logaritmy, a malé změny růstové rychlosti mohou tedy odpovídat velkým změnám biomasy. Hodnoty E_bC a E_rC tedy nejsou číselně srovnatelné.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- zkoušená látka: údaje o chemické identitě;
- zkušební organismus: původ, laboratorní kultura, číslo kmene, metoda kultivace;
- zkušební podmínky:
 - datum zahájení a ukončení zkoušky a délka zkoušení,
 - teplota,
 - složení média,

- kultivační zařízení,
 - hodnoty pH roztoku na počátku a na konci zkoušky (je-li pozorováno kolísání pH o více než 1, uvede se vysvětlení),
 - vehikulum a metoda použitá pro rozpouštění zkoušené látky, koncentrace vehikula ve zkušebních roztocích,
 - intenzita a kvalita světla,
 - zkoušené koncentrace (naměřené nebo nominální);
- výsledky:
- koncentrace buněk v jednotlivých baňkách v každé době měření a metoda měření koncentrace buněk,
 - průměrné hodnoty koncentrace buněk,
 - růstové křivky,
 - grafické znázornění vztahu koncentrace/účinek,
 - hodnoty EC a metoda výpočtu,
 - NOEC,
 - další pozorované účinky.

4. LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201*, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
 - (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.
-

*Doplněk***PŘÍKLAD POSTUPU KULTIVACE ŘAS****Obecné poznámky**

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity.

Měly by být použity vhodné metody k tomu, aby bylo zajištěno, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi (ISO 4833). Vhodné mohou být axenické kultury, avšak základem jsou jednodruhové kultury.

Všechny činnosti se provádějí za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami.

Přístroje a materiál

Viz bod 1.6.1 Příprava, část Zkušební organismy.

Postupy pro získání kultur řas*Příprava živných roztoků (médií)*

Všechny roztoky solí – živin se připraví jako koncentrované zásobní roztoky a skladují se v temnu a chladu. Sterilizují se filtrací nebo v autoklávu.

Médium se připraví přidáním správných množství zásobních roztoků do sterilizované destilované vody, přičemž se dbá na to, aby nedošlo k zanesení infekce. k získání pevného média se přidává 0,8 % 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.

Do baňky s čerstvým médiem se sterilní pipetou přenese takové množství „staré“ kultury, aby byla výchozí koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace staré kultury.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout koncentraci, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. Musí k tomu dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas vhodných pro naočkování zkušebních kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po třídní inkubační lhůtě. Obsahují-li kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

TOXICITA PRO ŽÍZALY
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**

LC₅₀: 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 zkušební metody 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 různými koncentracemi 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 zkušební metody 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 *Materiál*

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 nejbližší 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mleté);
- 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 (CaCO₃) přidaného pro úpravu pH na 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. Míšení musí být prováděno pečlivě, aby bylo dosaženo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. Způsob vpravení zkoušené látky do substrátu je třeba uvést ve zprávě.

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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

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.

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 žízalách 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 žízalách. 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 disperze zkoušené látky v deionizované vodě nebo v jiném rozpouštědle smísí se základním zkušebním substrátem nebo se na něj rovnoměrně 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 vytékají. 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 žízal, které byly před použitím 24 hodin aklimatizovány v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaveny přebytečné vody osušením na filtračním papíru.

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. Žízaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žízaly 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 žízaly 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 musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- 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),
- 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., Lofty, J. R., *Biology of Earthworms*, 1977, Chapman and Hall, London, 331 str.
- (3) Bouche, M. B., *Lombriens de France, Écologie et Systématique*, 1972, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 str.
- (4) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F., a simplified method of evaluation dose effect experiments, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 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.

Doplňěk

Množení a chov žízal před zkouškou

Pro účely množení se 30 až 50 dospělých žízal umístí do chovné schránky s čerstvým substrátem a vyjmou se po 14 dnech. Tyto jedince je možné použít pro další chovné vsázky. Žízaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (v uvedených podmínkách po dvou až třech měsících).

Podmínky chovu a množení

Klimatizovaná ko- teplota 20 ± 2 C, nejlépe s nepřetržitým osvětlením (intenzita 400–800 lx).
mora:

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 mokry.

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 člancích 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.

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, jsou-li 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⁻¹ nebo hodnotám CHSK od 100 do 1 000 mg·l⁻¹ (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.

1.2 **Definice a jednotky**

Po ukončení zkoušky se míra rozkladu označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou Zahn-Wellensovou 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⁻¹) (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku),

C_T = hodnoty DOC nebo CHSK zkušební směsi v době odběru vzorku (mg·l⁻¹),

C_B = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu v době odběru vzorku (mg·l⁻¹),

C_{BA} = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu tři hodiny po zahájení zkoušky (mg·l⁻¹).

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).

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⁻¹. Koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů nesmí překročit 2,7 mmol·l⁻¹; v opačném případě je nutné jako rozpouštědlo použít deionizovanou nebo destilovanou vodu.

Kyselina sírová p.a. 50 g·l⁻¹

Hydroxid sodný p.a. 40 g·l⁻¹

Minerální živné médium: v jednom litru deionizované vody se rozpustí:

Chlorid amonný NH₄Cl p.a. 38,5 g

Dihydrogenfosforečnan sodný, NaH₂PO₄·2H₂O p.a. 33,4 g

Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄ p.a. 8,5 g

Hydrogenfosforečnan draselný, K₂HPO₄ 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.

Zařízení pro membránovou filtraci.

Membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm. Vhodné membránové filtry nesmí během filtrace uvolňovat ani absorbovat uhlík.

Analýzátor 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 dosažena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku 50 až 400 mg na litr suspence. Odpovídající hodnoty CHSK jsou 100 až 1 000 mg·l⁻¹. Směs se doplní vodou do celkového objemu jeden až čtyři litry. Celkový zvolený objem je závislý na počtu odebrávaných 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 čistěn vatovým filtrem a přes promývačku. Musí být zajištěno, aby nedošlo k usazení kalu a aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 2 mg·l⁻¹.

V pravidelných intervalech (např. denně) se měří pH a podle potřeby se upraví na pH 7–8.

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 míchání). 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 odstředováním. 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 odlijí, dekantovaný kal v nádobě se doplní vodou na objem dvou litrů, 15 min 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 suspence.

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 lednici. Delší skladování se nedoporučuje.

CHSK se ve filtrátu vzorku stanoví analytickým postupem pro stanovení CHSK popsáním 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 musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- 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.

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, nejspříhodnější 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 ^{14}C . Při použití zkoušené látky značené ^{14}C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $^{14}\text{CO}_2$.

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 B*, Rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.
 - (2) Příloha v směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19. 9. 1984), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.
-

Doplňk

PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

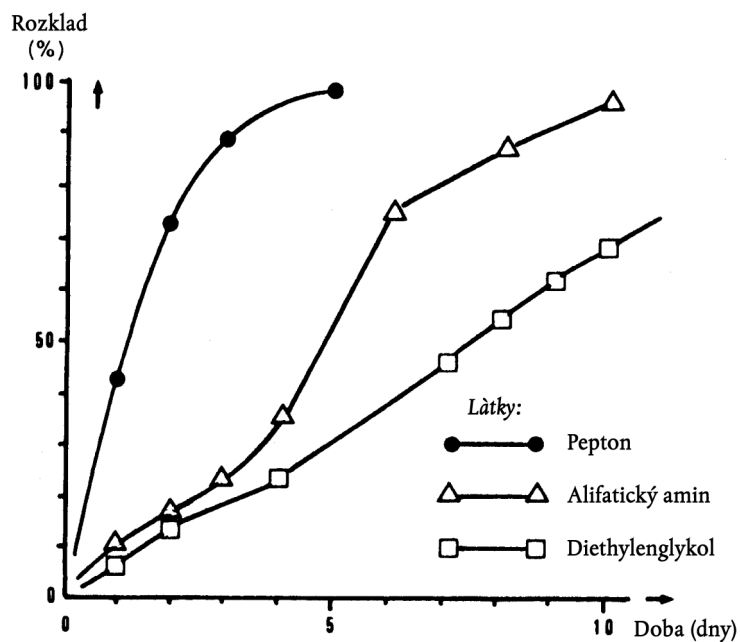
Organická látka:	4-ethoxybenzoová kyselina
Teoretická koncentrace ve zkoušce:	600 mg·l ⁻¹
Teoretický DOC:	390 mg·l ⁻¹
Inokulum:	čistírna odpadních vod v ...
Koncentrace:	1 g sušiny na litr
Adaptace:	bez adaptace
Analýza:	stanovení DOC
Množství vzorku:	3 ml
Referenční látka:	diethylenglykol
Toxicita zkoušené látky:	žádné toxické účinky při koncentraci menší než 1 000 mg·l ⁻¹ Použitá zkouška: zkouška ve fermentačních trubcích

Čas v průběhu zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	Slepý vzorek DOC ⁽¹⁾ mg·l ⁻¹	DOC ⁽¹⁾ mg·l ⁻¹	DOC (netto) mg·l ⁻¹	Rozklad %	DOC ⁽¹⁾ mg·l ⁻¹	DOC (netto) mg·l ⁻¹	Rozklad %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 h	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.

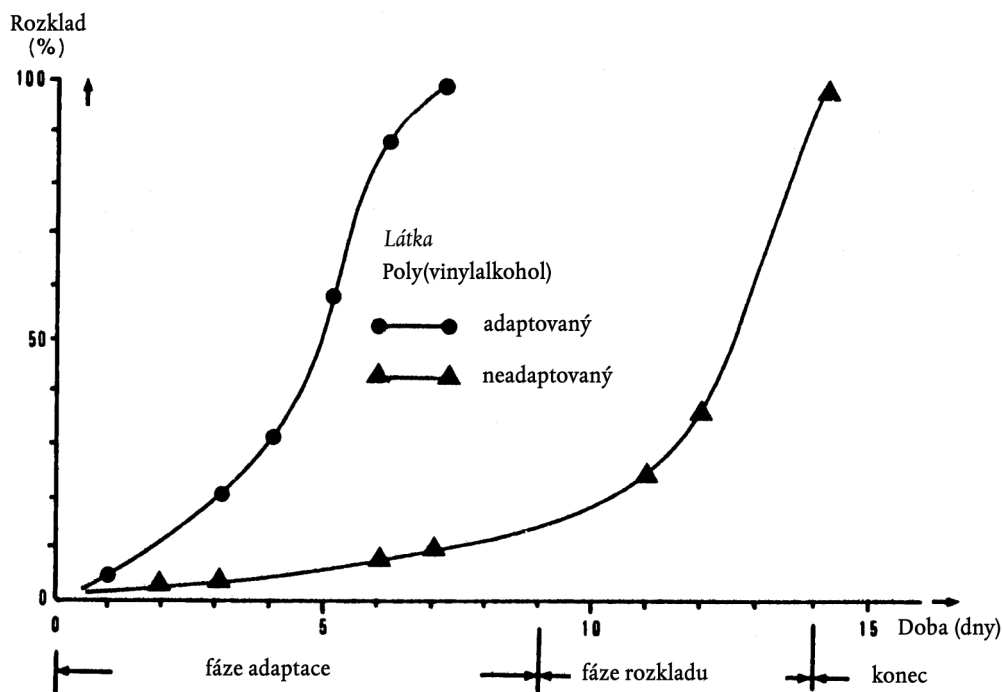
Obrázek 1

Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2

Příklady adaptace kalu



BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST
SIMULAČNÍ ZKOUŠKA S AKTIVOVANÝM KALEM

1. **METODA**

1.1 **Úvod**

1.1.1 *Obecné poznámky*

Metoda je vhodná pouze pro ty organické látky, které v koncentracích používaných ve zkoušce

— jsou natolik rozpustné ve vodě, aby bylo možné připravit zkušební roztoky,

— mají za zkušebních podmínek zanedbatelnou tenzi par,

— neinhibují bakterie.

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.

1.1.2 *Stanovení úplné biologické rozložitelnosti (analýza DOC/CHSK)*

Účelem metody je stanovení úplné biologické rozložitelnosti na základě měření úbytku zkoušené látky a vzniklých metabolitů v modelovém zařízení s aktivovaným kalem při koncentraci odpovídající DOC více než $12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (nebo CHSK přibližně $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$); optimální je koncentrace DOC $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku.)

Je nutné znát obsah organického uhlíku (nebo chemickou spotřebu kyslíku) zkoušené látky.

1.1.3 *Stanovení primární biologické rozložitelnosti (specifická analýza)*

Účelem metody je stanovení primární biologické rozložitelnosti látky specifickou metodou v modelovém zařízení s aktivovaným kalem při koncentraci přibližně $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (pokud to umožňuje analytická metoda nebo toxicita zkoušené látky, může být použita nižší nebo vyšší koncentrace zkoušené látky). To umožní odhadnout primární biologickou rozložitelnost látky (vymizení původní výchozí chemické struktury).

Účelem metody *není* stanovení stupně mineralizace zkoušené látky.

Ke kvantitativní analýze musí být k dispozici vhodná metoda.

1.2 **Definice a jednotky**

1.2.1 *Analýza DOC/CHSK*

Úbytek látky je vyjádřen vztahem:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100 \% \quad [1(a)]$$

kde:

DR = úbytek DOC nebo snížení CHSK v %, vztaženo na zkoušenou látku při dané střední době zdržení,

T = koncentrace zkoušené látky na přítoku do zkušební jednotky v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr),

E = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku ze zkušební jednotky v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr),

E_0 = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku z jednotky slepého pokusu v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr).

Rozklad je definován jako procentuální úbytek DOC nebo snížení CHSK při dané době zdržení, vztažený na zkoušenou látku.

1.2.2 *Specifická analýza*

Procentuální úbytek zkoušené látky ve vodné fázi (R_w) během dané doby zdržení je vyjádřen vztahem:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100 \% \quad [1(b)]$$

kde:

C_i = koncentrace látky v přítoku do zkušebního zařízení (v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, stanovená specifickou analýzou)

C_o = koncentrace látky na odtoku ze zkušebního zařízení (v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, stanovená specifickou analýzou),

1.3 **Referenční látky**

V některých případech může být při posuzování nových látek užitečné použít referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

1.4 **Princip zkušebních metod**

Ke stanovení úplné biologické rozložitelnosti se používají dvě paralelně pracující modelová zařízení s aktivovaným kalem (potvrzující zkouška OECD nebo zařízení s porézní nádobou). Zkoušená látka se přidává na přítoku do jedné z jednotek (se syntetickou odpadní vodou nebo s odpadní vodou z domácností), zatímco ve druhé je obsažena pouze odpadní voda. Ke stanovení primární biologické rozložitelnosti pomocí specifické analýzy zkoušené látky na přítoku a odtoku se používá pouze jedna jednotka.

Na odtoku se měří koncentrace DOC nebo CHSK nebo se stanoví koncentrace zkoušené látky specifickou analýzou.

Obsah DOC z materiálu obsaženého ve zkoušce se nestanovuje, pouze se uvede.

Při měření DOC (nebo CHSK) se vychází z toho, že rozdíl mezi průměrnými koncentracemi na odtoku ze zkušební a z kontrolní jednotky je způsoben nerozloženým podílem zkoušené látky.

Jestliže jsou prováděny specifické analýzy, lze stanovovat změny koncentrace původní chemické látky (primární biologická rozložitelnost)

Obě zařízení mohou být provozována jako „spřažená“ pomocí postupu vzájemné inokulace.

1.5 **Kritéria jakosti**

Výchozí koncentrace zkoušené látky se volí s ohledem na druh analytické metody a její mez stanovitelnosti.

1.6 **Popis zkušební metody**

1.6.1 *Příprava*

1.6.1.1 *Přístroje a pomůcky*

Pokud se neprovádí specifická analýza, používají se dvě modelové zkušební jednotky stejného typu.

Mohou být používány dva typy zařízení:

Potvrzující zkouška OECD

Zařízení (doplněk 1) se skládá ze zásobní nádoby (A) na syntetickou odpadní vodu, dávkovacího čerpadla (B), provzdušňovací nádoby (C), sedimentační nádoby (D), mamutky (E) k recirkulaci aktivovaného kalu a sběrné nádoby na vycištěnou vodu (F).

Nádoby (A a F) musí být ze skla nebo z vhodného plastu a musí mít objem nejméně 24 l. Čerpadlo (B) musí zajišťovat konstantní přítok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; může být použit jakýkoliv vhodný systém zjišťující stanovený přítok a koncentraci. Za normálních podmínek je výška separátoru (D) nastavena tak, aby objem kultivační suspence v provzdušňovací nádobě byl tři litry. v dolní části kónické části provzdušňovací nádoby (C) je ponořena porézní provzdušňovací krychlička (G). Množství dodávaného vzduchu může být kontrolováno průtokoměrem.

Mamutka (E) je osazena tak, aby byl aktivovaný kal ze separátoru do provzdušňovací nádoby dopravován nepřetržitě a stejnoměrně.

Zařízení s porézní nádobou

Porézní nádoba je vyrobena z porézní polyethylenové fólie (tloušťka 2 mm, maximální velikost pórů 95 µm) stočené do válce o průměru 14 cm s kónickým dnem 45° (obrázky 1 a 2 v doplňku 2). Porézní nádoba je umístěna v nepropustné nádobě o průměru 15 cm zhotovené z vhodného plastu, která má nad kónickou částí odtok ve výšce 17,2 cm, čímž je vymezen objem nádoba (3 litry). Na horním konci vnitřní nádoby je upevněn kruhový držák z vhodného plastu tak, že mezi vnější a vnitřní nádobou je 0,5 cm odtoková mezera.

Porézní nádoba může být umístěna do vodní lázně regulované termostatem. Na dno vnitřní nádoby je vhodným rozvaděčem přiváděn vzduch.

Nádoby (A) a (E) musí být ze skla nebo z vhodného plastu a musí mít objem nejméně 24 l. Čerpadlo (B) musí zajišťovat konstantní přítok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; může být použit jakýkoliv vhodný systém zajišťující stanovený přítok a koncentraci.

K dispozici musí být náhradní porézní nádoby jako náhrada za zanesené nádoby; zanesené nádoby se čistí ponořením do roztoku chlornanu na 24 h a promytím tekoucí vodou.

1.6.1.2 Filtrace

Používají se zařízení pro membránovou filtraci a membránové filtry o velikost pórů 0,45 µm. Vhodný membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík a při filtraci nesmí adsorbovat zkoušenou látku.

1.6.1.3 Odpadní voda

Může být použito buď vhodné syntetické živné médium nebo odpadní voda z domácností.

Příklad syntetického živného média

V 1 l vodovodní vody se rozpustí:

Pepton	160 mg
masový extrakt	110 mg
Močovina	30 mg
NaCl	7 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg
K ₂ HPO ₄	28 mg

Odpadní vody z domácností:

Odebírají se čerstvé každý den z přeřadu mechanického stupně čistírny, která čistí převážně odpadní vody z domácností.

1.6.1.4 Zásobní roztok zkoušené látky

Připraví se např. 1 % roztok zkoušené látky, který se bude přidávat do zkušební jednotky. Stanoví se koncentrace zkoušené látky, aby mohl být určen příslušný objem zásobního roztoku, který se přidá k odpadní vodě nebo přímo dalším čerpadlem do zkušební jednotky, aby byla dosažena požadovaná zkušební koncentrace.

1.6.1.5 Inokulum

Poznámka: Je-li používána odpadní voda z domácností, není důvod používat inokulum s malou koncentrací bakterií, ale může se použít aktivovaný kal.

Mohou být použita inokula z různých zdrojů.

Tři příklady vhodného inokula:

a) Inokulum z odtoku biologické čistírny odpadních vod

Inokulum se získá z odtoku dobře fungující čistírny zpracovávající převážně odpadní vody z domácností. Vzorek odtoku musí být v době mezi odběrem a použitím uchován v aerobních podmínkách. Inokulum se připraví filtrací vzorku vody přes hrubý filtr, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Až do okamžiku použití se filtrát uchovává v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito v též den, kdy bylo odebráno. k inokulaci se použijí nejméně 3 ml.

b) Směsné inokulum

Inokulum z odtoku biologické čistírny odpadních vod:

Viz předchozí popis.

Inokulum z půdy:

100 g zahradní zeminy (úrodná, nesterilní zemina) se suspenduje v 1 nechlorované pitné vody. (Zeminy s extrémně vysokým obsahem jílu, písku nebo humusu nejsou vhodné.) Po zamíchání se nechá suspence 30 min usazovat. Supernatant se zfiltruje přes hrubý filtrační papír, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Filtrát se ihned provzdušňuje až do okamžiku použití. Inokulum musí být použito v týž den, kdy bylo odebráno.

Inokulum z povrchové vody:

Další díl směsného inokula se získá z mesosaprobních povrchových vod. Odebraný vzorek se zfiltruje přes hrubý filtrační papír, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Až do okamžiku použití se filtrát uchovává v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito v týž den, kdy bylo odebráno.

Stejně objemové díly tří dílčích inokul se smísí, dobře promíchají a z této směsi se odebere konečné inokulum. k inokulaci se použijí nejméně 3 ml.

c) Inokulum z aktivovaného kalu

Jako inokulum se použije aktivovaný kal (ne více než 3 litry) (s obsahem suspendovaných pevných částic do 2,5 g·l⁻¹) odebraný z provzdušňovací nádrže čistírny zpracovávající převážně odpadní vody z domácností.

1.6.2 Postup

Zkouška se provádí při laboratorní teplotě udržované mezi 18 a 25 °C.

Zkouška může být podle potřeby prováděna při nižších teplotách (do 10 °C); pokud se zkoušená látka za těchto podmínek rozkládá, nejsou zapotřebí žádná další měření. Jestliže se však látka při nižší teplotě nerozkládá, musí být zkouška opakována při teplotě 18 až 25 °C.

1.6.2.1 Fáze zapracování; tvorba kalu/stabilizace zařízení

Fází růstu/stabilizace kalu je období, během kterého dochází za provozních podmínek k ustálení koncentrace suspendovaných částic aktivovaného kalu a funkce zkušební jednotky.

Rozběhová fáze začíná první vsádkou zkoušené látky a končí dobou, kdy naměřený úbytek zkoušené látky dosáhne plató (poměrně konstantní hodnoty). Tato fáze nesmí trvat déle než 6 týdnů.

Hodnotící fáze je doba trvající tři týdny, která se počítá od okamžiku, kdy úbytek zkoušené látky dosáhl poměrně konstantní, zpravidla vysoké hodnoty. u látek, které se během šesti týdnů rozložily málo nebo se nerozložily vůbec, se za vyhodnocovací fázi považuje období dalších tří následujících týdnů.

Na začátku zkoušky se zkušební jednotka (jednotky) naplní zkušební kapalinou s inokulem.

Spustí se provzdušňování (a mamutka (E) v případě použití zkušebního zařízení podle OECD) a zapne se dávkovací zařízení (B).

Přítok odpadních vod bez zkoušené látky do provzdušňovací nádoby (C) se udržuje na hodnotě jeden litr nebo půl litru za hodinu; doba zdržení tak dosáhne tří nebo šesti hodin.

Intenzita provzdušňování musí být regulována tak, aby se obsah provzdušňovací nádoby (C) udržoval ve vzhledu a obsahu rozpuštěného kyslíku neklesl pod hodnotu 2 mg·l⁻¹.

Pěnění směsi musí být zabráněno vhodnými prostředky. Nesmí být použity odpěňovače, které inhibují aktivovaný kal.

Kal, který se shromažďuje v horní části provzdušňovací nádoby (C) (a u potvrzujících zkoušky OECD na dně sedimentační nádoby (D) a v cirkulačním okruhu), musí být alespoň jednou za den vrácen do matečné suspence setřením nebo jiným vhodným způsobem.

Jestliže kal nesedimentuje, lze zvýšit jeho hustotu přidáním 2 ml 5 % roztoku chloridu železitého a přidávek podle potřeby opakovat.

Odtok ze sedimentační nádrže se shromažďuje v nádobách (E nebo F) po dobu 20–24 h; před odebráním vzorku se směs důkladně promíchá. Nádoby (E nebo F) se musí pečlivě čistit.

Pro potřeby sledování a řízení účinnosti procesu se stanoví nejméně dvakrát týdně CHSK nebo DOC zfiltrovaného průměrného vzorku výtoku ze zařízení a zfiltrované směsi dávkované do zařízení (k filtraci se používá membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm a prvních (přibližně) 20 ml filtrátu se odstraní).

Když se rozkladné procesy ustálí, vyrovnají se i poklesy CHSK nebo DOC.

Sušina kalu v provzdušňovací nádobě se stanovuje dvakrát týdně (v g·l⁻¹). Zařízení mohou být provozována dvěma způsoby: buď se sušina kalu v provzdušňovací nádobě stanovuje dvakrát týdně, a pokud je sušina kalu vyšší než 2,5 g·l⁻¹, přebytečný kal se vypustí, nebo se denně odebere z každé nádoby 500 ml suspence, takže střední doba zdržení kalu v zařízení je šest dní.

Jestliže jsou naměřené a hodnocené parametry (účinnost procesu stanovená na základě úbytku CHSK nebo DOC, koncentrace kalu, schopnost sedimentace kalu, zákal kapalně fáze atd.) obou jednotek dostatečně stabilní, může být zahájeno přidávání zkoušené látky podle bodu 1.6.2.2 do přítoku do jedné z jednotek.

Jinou možností je přidat zkoušenou látku na začátku fáze růstu kalu (1.6.2.1), a to zejména tehdy, je-li jako inokulum používán aktivovaný kal.

1.6.2.2 Zkušební postup

Při dodržování podmínek pro rozběhovou fázi se do přítoku do zkušebního zařízení přidává zásobní (asi 1 %) roztok zkoušené látky, aby bylo dosaženo požadované koncentrace materiálu v suspensi (DOC v rozmezí 10–20 mg·l⁻¹ nebo CHSK 40 mg·l⁻¹). To lze provádět denním přimícháváním zásobního roztoku do odpadní vody nebo jeho přiváděním pomocí samostatného čerpadla. Této koncentrace může být dosaženo postupně. Nemá-li zkoušená látka toxické účinky pro aktivovaný kal, mohou být zkoušeny i vyšší koncentrace.

Do jednotky se slepým vzorkem se dává pouze odpadní voda bez zkoušené látky. Z odtoku se odebírají vzorky pro analýzu a filtrují se přes membránový filtr (0,45 µm), přičemž se prvních přibližně 20 ml filtrátu odstraní.

Filtráty vzorků musí být analyzovány v den odběru nebo musí být vhodně konzervovány, např. přidáním 0,05 ml 1 % chloridu rtuťnatého (HgCl₂) na každých 10 ml filtrátu nebo uložením na 24 h při teplotě 2–4 °C nebo při teplotě -18 °C na delší dobu.

Rozběhová fáze od okamžiku přidání zkoušené látky by neměla překročit šest týdnů a vyhodnocovací fáze by neměla být kratší než tři týdny, tak aby bylo k dispozici 14–20 stanovení pro výpočet konečného výsledku.

Spřažená zařízení

Spřažení se dosáhne tak, že se mezi zařízeními jednou denně vymění 1,5 l suspence (včetně kalu) z aeračních nádob. Dochází-li k silné adsorpci zkoušené látky, odebere se 1,5 l kapalně fáze ze sedimentační nádoby a přidá se do nádoby s aktivovaným kalem druhého zařízení.

1.6.2.3 Analýza

Ke sledování chování zkoušené látky mohou být použity dvě metody:

stanovení DOC a stanovení CHSK.

Hodnoty DOC se stanoví duplicitně pomocí analyzátoru uhlíku a hodnoty CHSK se stanoví podle literatury (2).

Specifická analýza

Koncentrace zkoušené látky se stanoví vhodnou analytickou metodou. Je-li to možné, stanoví se také množství látky adsorbované na aktivovaný kal.

2. ÚDAJE a VYHODNOCENÍ

2.1 Spřažená zařízení

Jsou-li použita spřažená zařízení, vypočte se denně stupeň odstranění DR , a to postupem podle bodu 1.2.1.

Tyto denní hodnoty stupně odstranění DR se opraví na hodnotu DR_c zohledňující přenos materiálu při očkování; tento výpočet se provádí podle rovnice [2] pro střední dobu prodlení tři hodiny nebo podle rovnice [3] pro střední dobu prodlení šest hodin.

$$DR_c = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Ze získaných hodnot se vypočte jejich průměr a dále směrodatná odchylka podle rovnice:

$$s_{DR_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (D\bar{R} - DR_{c_i})^2}{n - 1}} \quad [4]$$

kde:

s_{DR_c} = směrodatná odchylka hodnot DR_c ,

$D\bar{R}$ = průměr hodnot DR_c ,

n = počet stanovení.

Odlehle hodnoty DR_c se vyloučí vhodnou statistickou metodou, např. Nalimovovou metodou (6) na hladině významnosti 95 %, průměr a směrodatná odchylka se poté opět vypočtou bez odlehle hodnot DR_c .

Výsledná hodnota se poté vypočte podle rovnice [5]:

$$DR = D\bar{R} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR_c} \quad [5]$$

kde:

$t_{n-1; \alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot E a E_0 a hladinu významnosti P ($P = 1 - \alpha$), kde $P = 95 \%$ (1).

Výsledkem je střední hodnota na hladině významnosti 95 %, příslušná směrodatná odchylka, počet hodnot DR_c bez odlehle hodnot a počet odlehle hodnot, například

$DR_c = 98,6 \pm 2,3 \%$ úbytku DOC,

$s = 4,65 \%$ úbytku DOC,

$n = 18$,

x = počet odlehle hodnot.

2.2 Nespřažená zařízení

Provozní výkon zařízení může být ověřen následovně:

$$\% \text{ odstranění CHSK nebo DOC} = \frac{(\text{CHSK nebo DOC odp. vody} - \text{CHSK nebo DOC výtoku})}{(\text{CHSK nebo DOC odp. vody})} \times 100$$

Denním vynášením naměřených hodnot úbytků do grafu se projeví všechny tendence, např. adaptace.

2.2.1 Využití stanovení CHSK/DOC

Denní hodnota stupně odstranění DR se vypočte podle bodu 1.2.1.

Vypočte se průměr z denních hodnot; kromě toho se podle rovnice [6] vypočte směrodatná odchylka:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (D\bar{R} - DR_i)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

kde:

s_{DR} = směrodatná odchylka hodnot DR_i ,

$D\bar{R}$ = průměr hodnot DR_i ,

n = počet stanovení.

Odlehle hodnoty DR se vyloučí vhodnou statistickou metodou, např. Nalimovovou metodou (6) na hladině významnosti 95 %, a průměr a směrodatná odchylka se poté opět vypočtou bez odlehých hodnot DR .

Výsledná hodnota se vypočte podle rovnice [7]:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \quad [7]$$

kde:

$t_{n-1; \alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot E a E_0 a hladinu významnosti P ($P = 1 - \alpha$), kde $P = 95 \%$ (1).

Výsledkem je střední hodnota na hladině významnosti 95 %, příslušná směrodatná odchylka, počet hodnot DR_c bez odlehých hodnot a počet odlehých hodnot, například

$DR = 98,6 \pm 2,3 \%$ úbytku DOC,

$s = 4,65 \%$ úbytku DOC,

$n = 18$,

x = počet odlehých hodnot.

2.2.2 Postup při specifické analýze

Odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_c) v % se vypočte podle bodu 1.2.2.

3. ZPRÁVY

3.1 Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- formulář uvedený v doplňku 3 s pracovními podmínkami zkoušky,
- druh použitého zkušebního zařízení (zařízení potvrzující zkoušku OECD nebo zařízení s porézní nádobou),
- způsob provozování zařízení: spřažená nebo nespřažená zařízení,
- druh odpadních vod: syntetické nebo odpadní vody z domácností, u odpadních vod z domácností datum a místo odběru,
- druh inokula, datum a místo odběru,
- popis použitých analytických metod, pokud byly prováděny specifické analýzy,
- grafické vyjádření závislosti úbytku CHSK nebo DOC na čase během rozběhové a vyhodnocovací fáze,
- analytický výtěžek stanovení obsahu zkoušené látky prostřednictvím CHSK nebo DOC v zásobním roztoku,
- při provádění specifické analýzy grafické vyjádření závislosti procentuálního úbytku zkoušené látky z kapalné fáze na čase (během rozběhové a vyhodnocovací fáze),
- střední úbytek DOC nebo CHSK zkoušené látky a směrodatná odchylka vypočtené z výsledků získaných během vyhodnocovací fáze, tj. kdy je úbytek zkoušené látky konstantní nebo kdy se poměr ustálil,
- grafické vyjádření závislosti koncentrace aktivovaného kalu na čase,
- jakékoli poznámky týkající se aktivovaného kalu (odstraňování přebytečného kalu ze zařízení, tvorba shluků, použití $FeCl_3$ atd.),
- koncentrace zkoušené látky použité ve zkoušce,
- všechny výsledky analýz kalu,
- všechny informace a experimentální výsledky týkající se zkoušené látky a referenční látky, pokud byla použita,
- vědecké zdůvodnění všech odchylek a změn metody.

3.2 Interpretace výsledků

Příčinou nízké hodnoty úbytku zkoušené látky z vodné fáze může být inhibice mikroorganismů způsobená zkoušenou látkou. Projevuje se to především rozpouštěním a ztrátou kalu, zakalováním kapalně fáze a snížením účinnosti odstraňování CHSK nebo DOC v zařízení.

Někdy hraje roli fyzikálně-chemická adsorpce. Mezi biologickým působením na molekuly látky a její fyzikálně-chemickou adsorpcí je možné rozlišit pomocí analýzy kalu po odpovídající desorpci.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky.

To lze provést několika způsoby, nejspřávnější je však použít supernatant jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrií).

Vysoké hodnoty úbytku DOC nebo CHSK jsou zpravidla způsobeny biologickým rozkladem, při nízkých hodnotách úbytku nelze odlišit biologický rozklad od jiných mechanismů odstranění látky. Pokud např. rozpustná sloučenina vykazuje vysoký stupeň adsorpce (98 %) a denně je odstraňováno 10 % kalu, dochází až ke 40 % odstranění látky z tohoto kalu; je-li denně odstraňováno 30 % kalu, může eliminace na základě adsorpce a odstranění kalu vzrůst na 65 % (4).

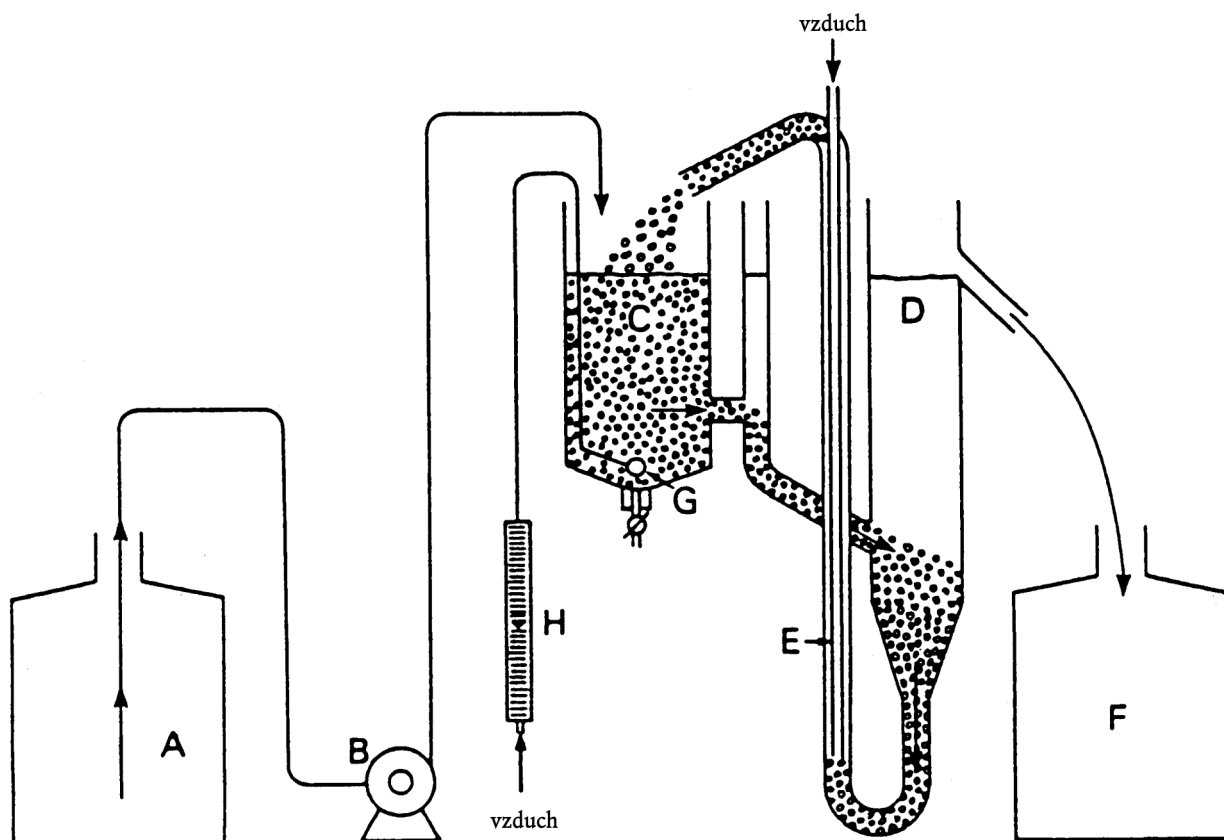
Při použití specifických analýz je třeba věnovat pozornost vlivu struktury látky na specifickou analýzu. Úbytek látky stanovený specifickou analýzou nemůže být interpretován jako mineralizace látky.

4. LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A*, Rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.
 - (2) Příloha v směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19. 9. 1984), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.
 - (3) Painter H. A., King E. F., WRC Porous Pot method for assessing biodegradability, Technical report TR70, červen 1978, Water Research Center, Velká Británie.
 - (4) Wierich P., Gerike P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5, 2, červen 1981, str. 161 – 171.
 - (5) Směrnice Rady 82/242/EHS a 82/243/EHS (Úř. věst. L 109, 22. 4. 1982, kterými se mění směrnice Rady 73/404/EHS a 73/405/EHS o biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek (Úř. věst. L 347, 17. 12. 1973)).
 - (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), str. 406 – 408.
-

Doplňěk 1

Obrázek 1

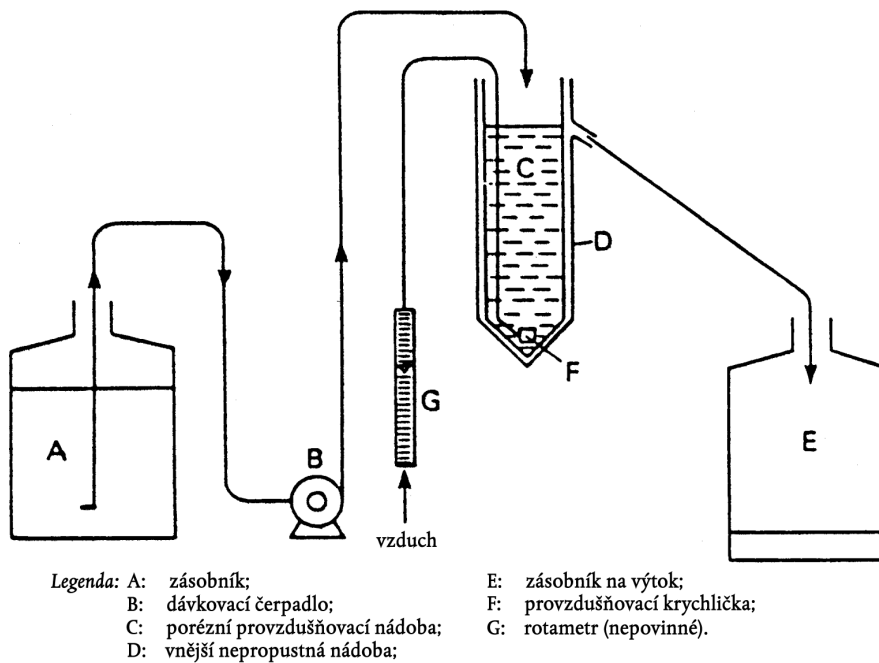


- Legenda: A: zásobník
 B: dávkovací zařízení
 C: provzdušňovací nádoba (kapacita 3 l)
 D: sedimentační nádoba
 E: mamutka
 F: zásobník na výtok
 G: provzdušňovací krychlička
 H: průtokoměr (nepovinné)

Doplňěk 2

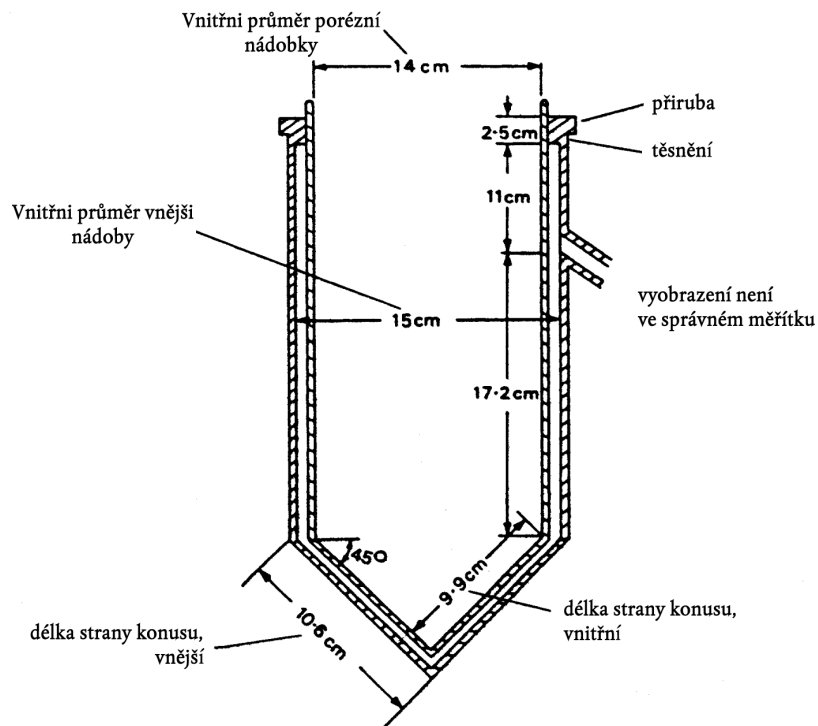
Obrázek 1

Zařízení používané pro stanovení biologické rozložitelnosti



Obrázek 2

Detaily třílitrové porézní provzdušňovací nádoby



Doplňěk 3

Pracovní podmínky simulační zkoušky s aktivovaným kalem

Zaškrtně se pro každou skupinu

Zařízení

Průkazná zkouška OECD
Zařízení s porézní nádobou

Způsob provozu

samostatná jednotka
spřažená zařízení
nespřažená zařízení

Přeočkování

Žádné
aktivované kalem
kapalnou fází vzniklou po sedimentaci

Střední doba zdržení

3 hodiny
6 hodin

Živné médium

odpadní voda z domácností
syntetická odpadní voda

Inokulum

z čistírny odpadních vod
směsné inokulum
aktivovaný kal

Přidání zkoušené látky

na začátku
Postupně
po vytvoření kalu

Analýzy

Specifická
CHSK
DOC

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 nejnadhěji 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.

Pro výpočet inhibičního účinku zkoušené látky při určité koncentraci se respirační rychlost vyjadřuje v procentech průměrné hodnoty dvou kontrolních respiračních rychlostí:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \% \text{ inhibice}$$

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 popsanych 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 min a/nebo pro 3 h) 3,5-dichlorfenolu leží v přijatelném rozmezí 5–30 mg l⁻¹.

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⁻¹.

1.6.1.2 Roztok kontrolní látky

Roztok 3,5-dichlorfenolu lze připravit například rozpuštěním 0,5 g 3,5-dichlorfenolu v 10 ml 1M NaOH, zředěním na přibližně 30 ml destilovanou vodou, za míchání přidáním 0,5M H₂SO₄ do začínajícího srážení – bude potřeba asi 8 ml 0,5M H₂SO₄ – a 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 CaCl₂·2H₂O,
- 0,2 g MgSO₄·7H₂O,
- 2,8 g K₂HPO₄.

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. 6. 1976), s přidávkem hydrogenufosforečnanu 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 min) a dekantovat horní vrstvu jemnějších pevných částic pro použití. Alternativně je možné kal několik sekund promíchávat.

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⁻¹. Dodrží-li se níže doporučený postup získá se zkušební médium s koncentrací kalu 0,8 až 1,6 g·l⁻¹.

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⁻¹

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 C₁).

Zkušební nádoby je nutno nepřetržitě provzdušňovat, aby bylo zaručeno, že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 2,5 mg·l⁻¹, a aby těsně před měřením respirační rychlosti byla koncentrace kyslíku přibližně 6,5 mg·l⁻¹.

V čase „15 min“ (15 min 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 min 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 tímž 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 min a/nebo tři hodiny (doba kontaktu).

2. ÚDAJE a VYHODNOCENÍ

Respirační rychlost se vypočte ze záznamu zapisovače mezi koncentracemi O_2 přibližně $6,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, nebo za období deseti minut, je-li respirační rychlost nízká. Úsek respirační křivky, ze které se vyhodnocuje respirační rychlost, musí být lineární.

Je-li 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 ($5\text{--}30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 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.

3. ZPRÁVY

3.1 Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- 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 Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, také popsáno v:
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser*, 117, 1976, str. 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredlung*, 6, 1977, str. 247.
 - (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
-

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 přídávky 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 h) 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 $C_{\text{celk}} - C_{\text{anorg}}$ se doporučuje stanovit DOC po okyselení a přečištění.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární 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.

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 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$),

C_i = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušebního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$),

C_e = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu kontrolního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

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:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

kde D_{da} = rozklad/denní přírůstek.

2. Procentuální úbytek D_{ssd} množství látky přítomné na začátku každého dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

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.

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 h provzdušňuje. Provzdušňování se poté ukončí, kal se nechá usadit a supernatant se odstraní.

Zbývající kal v provzdušňovací komoře se pak smísí s další alikvotní částí 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 (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.

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 zbytku 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 očkovaním, 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 hodin se provzdušňování ukončí a kal se nechá 45 minut usazovat. Postupně se otevrou kohouty všech nádob a odeberou se 100 ml podíly supernatantu. Ke zbývajícimu 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 směšného 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⁻¹). Znovu se zahájí provzdušňování a pokračuje se v něm 23 h. Kal se poté nechá 45 min usazovat, odebere se supernatant a analyzuje se na obsah rozpuštěného organického uhlíku.

Výše uvedený postup plnění a odběru se opakuje v průběhu zkoušky denně.

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 1.2).

3. ZPRÁVY

3.1 Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- 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.

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, nejspřávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrii).

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 nižší koncentrací 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 $^{14}\text{CO}_2$.

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 zkušebním médiu.

4. LITERATURA

- (1) OECD Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.

Doplňek 1

Zkouška SCAS: příklad výsledků

Látka	C_T ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	$C_i - C_c$ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	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
4-nitrofenol	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

Doplňek 2

Příklad zkušební aparatury

Obrázek 1

