

II

(Nelegislativní akty)

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 640/2012

ze dne 6. července 2012,

kterým se přizpůsobuje technickému pokroku nařízení (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

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

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízení Komise (ES) č. 440/2008⁽²⁾ obsahuje zkušební metody pro určování fyzikálně-chemických vlastností látek, jejich toxicity a ekotoxicity, které se mají používat pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006.

(2) Nařízení (ES) č. 440/2008 je třeba aktualizovat a přednostně do něj zahrnout nové a aktualizované alternativní zkušební metody, jež nedávno schválila OECD, aby v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat

používaných pro vědecké účely⁽³⁾ a směrnicí 86/609/EHS Rady ze dne 24. listopadu 1986 o sblížení právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely⁽⁴⁾ došlo ke snížení počtu zvířat používaných pro pokusné účely. Se zúčastněnými stranami byla tato předloha konzultována.

(3) Nařízení (ES) č. 440/2008 je proto třeba odpovídajícím způsobem změnit.

(4) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem výboru zřízeného podle článku 133 nařízení (ES) č. 1907/2006,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Příloha nařízení (ES) č. 440/2008 se mění v souladu s přílohou tohoto nařízení.

Článek 2

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

(1) Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

(2) Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1.

(3) Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.

(4) Úř. věst. L 358, 18.12.1986, s. 1.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 6. července 2012.

Za Komisi
předseda
José MANUEL BARROSO

PŘÍLOHA

Příloha nařízení (ES) č. 440/2008 se mění takto:

1. Kapitola B.42 se nahrazuje tímto:

.B.42. SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a na nich založené zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. Již dříve byla přijata původní zkušební metoda (ZM) pro stanovení senzibilizace kůže u myši, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429; kapitola B.42 této přílohy) (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná metoda LLNA je založena na posouzení zkušeností a vědeckých údajů (12). Jedná se o druhou ZM, která je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Druhá zkušební metoda (tzn. podle zkušební metodiky OECD č. 406 nebo kapitoly B.6 této přílohy) využívá zkoušky na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA poskytuje oproti metodě uvedené v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13) určité výhody, pokud jde o dobré životní podmínky zvířat. Tato aktualizovaná zkušební metoda LLNA obsahuje sadu standardů funkčnosti (dodatek 1), které lze používat k posouzení stavu validace nových a/nebo modifikovaných zkušebních metod, které jsou funkčně a mechanicky podobné metodě LLNA, v souladu se zásadami uvedenými v Pokynu OECD č. 34 (14).
2. Metoda LLNA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky pro zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) jsou vhodné také pro metodu LLNA (6) (8) (15). V této ZM je jako alternativa popsána také redukovaná metoda LLNA (rLLNA), při které by se mohlo používat až o 40 % méně zvířat (16) (17) (18). Metodu rLLNA lze použít, když právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu metody LLNA popsané v této ZM. Predikce negativního výsledku by měla být založena na všech dostupných informacích popsanych v odstavci 4. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou v rozporu s původním očekáváním získány při použití metody rLLNA pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky. Metoda rLLNA by se neměla používat k zjišťování nebezpečnosti látek, které se používají při zkouškách senzibilizace kůže, pokud jsou zapotřebí informace ohledně závislosti odezvy na dávce, například při podrobném dílčím třídění látek pro účely nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí nebo pro účely globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemických látek OSN.

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 2.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Metoda LLNA představuje alternativní metodu pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA měla používat ve všech případech namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace by se měly posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA – viz odstavec 5), a také aby se usnadnila volba dávkování.
5. Zkušební metoda LLNA je metodou *in vivo*, a tudíž taková neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Tato metoda však umožňuje snížit počet zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho metoda LLNA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace. Metoda LLNA je založena na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) metoda LLNA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (13). Díky tomu metoda LLNA snižuje bolest a utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406, je třeba si uvědomit, že existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (13) (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže [jako jsou například některé chemikálie typu povrchové aktivních látek] (19) (20) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406)

(13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (21). Na základě omezené validační databáze, která se skládala převážně z pesticidních přípravků, je pravděpodobnější, že u těchto druhů zkoušených látek poskytne pozitivní výsledek metoda LLNA nežli zkouška na morčatech (22). Avšak při testování přípravků by se dalo uvažovat o možnosti použít podobné látky se známými výsledky jakožto srovnávací látky, které prokážou, že metoda LLNA funguje správně (viz odstavec 16). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Základní podstata metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a účinnosti aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním střední proliferace u každé zkušební skupiny se střední proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr střední proliferace u každé z exponovaných skupin ke střední proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být větší nebo rovna třem, aby bylo zařazení zkoušené látky mezi potenciální senzibilizátory kůže oprávněné. Zde popsané postupy jsou založeny na použití radioaktivního značení *in vivo* k měření zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. K posouzení počtu proliferujících buněk však lze použít i jiné ukazatele za předpokladu, že jsou zcela splněny požadavky standardů funkčnosti (viz dodatek 1).

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myši z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % střední hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (23), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzivní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvě, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžně pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Pozitivní kontrolu při každé studii také vyžadují některé regulační orgány, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 3 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná

- (tzn. že hodnota $SI > 20$ by byla příliš velká). K upřednostňovaným látkám, které se používají jako pozitivní kontrola, patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1) a 5 % roztok 2-sulfanylbenzothiazolu (CAS 149-30-4) v *N,N*-dimethylformamidu (viz dodatek 1, tabulka 1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.
12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratorů, které provádějí zkoušky LLNA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).
 13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.
 14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (12).
 15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (24). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.
 16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:
 - strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,
 - známé fyzikálně-chemické vlastnosti,
 - podklady ze zkoušky LLNA,
 - podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nezávislých jiných zkoušek – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–14). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (3) a (5). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (3) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21–24).
19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), N,N-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (19), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo komerční přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.
20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílů mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 35). Kromě toho je vhodné posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (12). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Souhrnné údaje za všechna zvířata mohou být nicméně některými regulačními orgány považovány za přijatelné, přičemž v takových situacích se mohou uživatelé rozhodnout, zda zvolí individuální nebo souhrnné údaje.

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezení vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.
22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění kůže je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myši ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30)(32) (33) (34).
24. O systémové toxicitě (35) (36) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: změny fungování nervového systému (např. piloerectce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činnosti týkající se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo jeví známky silného a trvalého utrpení, by se měla humánně usmrtit (37).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

- *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hrbet každého ucha se aplikuje 25 μ l vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávne jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).
- *Den 2 a den 3:* Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.
- *Den 4 a den 5:* Žádná aplikace.
- *Den 6:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchne 250 μ l fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS) obsahujícího 20 μ Ci ($7,4 \times 10^5$ Bq) [3 H]thymidinu (tritiovaného na metylu). Jinou možností je všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250 μ l PBS obsahujícího 2 μ Ci ($7,4 \times 10^4$ Bq) [125 I]joddeoxyuridinu a 10^{-5} M fluordeoxyuridinu. O pět hodin (5 hod.) později se zvířata humánně usmrtí. U každého zvířete se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se v PBS (individuální přístup) nebo se lymfatické uzliny vyjmou na obou stranách u všech myší z celé zkušební skupiny a společně se uloží do PBS (přístup založený na sdružení exponované skupiny). Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (12). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

Příprava buněčných suspenzí

26. Jednobuněčné suspenze obsahující buňky vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší a pocházejících od jednotlivých zvířat nebo od celé exponované skupiny se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 μ m sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze. Buňky lymfatických uzlin se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a jejich DNA se nechá vysrážet s 5 % kyselinou trichloroctovou při 4 °C po dobu 18 hod. (3). Sediment se buď resuspenduje v 1 ml kyseliny trichloroctové a přemísť do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity 3 H, nebo se přeneše přímo do zkumavek pro měření aktivity 125 I.

Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)

27. Inkorporace [3 H]thymidinu se měří β -scintilační metodou a vyjadřuje se počtem rozpadů za minutu (DPM). Inkorporace [125 I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity 125 I a rovněž se vyjadřuje v DPM. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v DPM na zvíře (individuální přístup) nebo v DPM na zkušební skupinu (sdružený přístup).

Redukovaná metoda LLNA

28. V určitých situacích, kdy právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, lze použít volitelný protokol zkoušky rLLNA (16) (17) (18) vyžadující menší počet zvířat, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu LLNA popsané v této ZM. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou získány pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky.

29. Snížení počtu dávkových skupin je jediný rozdíl mezi protokoly zkušebních metod LLNA a rLLNA, a proto zkouška rLLNA neposkytuje informace o závislosti odezvy na dávce. Proto by se metoda rLLNA neměla používat, když je nutno získat informace o závislosti odezvy na dávce. Stejně jako při vícedávkové zkoušce LLNA by měla hodnocená koncentrace látky zkoušené metodou rLLNA být maximální koncentrací, která nevyvolává zjevnou systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myši (viz odstavec 18).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

30. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (37).

Hodnoty tělesné hmotnosti

31. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

32. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako index stimulace (SI). Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty DPM na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty DPM na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1. Při sdruženém přístupu se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované radioaktivity u jednotlivých exponovaných skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI.
33. Výsledek se považuje za pozitivní, když $SI \geq 3$. Avšak při rozhodování, zda prohlásit hraniční výsledek za pozitivní, lze použít rovněž intenzitu odezvy na dávku, statistickou významnost a shodnost odezvy při použití rozpouštědla/vehikula a při použití pozitivní kontroly (4) (5) (6).
34. Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, měla by se věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myši způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími a. s.pekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (7).
35. Shromáždění údajů o radioaktivitě na úrovni jednotlivých myši umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnetovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehle hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

36. Údaje by se měly shrnout do tabulky. Při použití individuálního přístupu se uvedou hodnoty DPM získané za jednotlivá zvířata, průměrná hodnota DPM na zvíře za celou skupinu, příslušný chybový výraz (např. směrodatná odchylka – SD, směrodatná odchylka průměrných hodnot – SEM) a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem. Při použití sdruženého přístupu se uvedou průměrné/mediánové hodnoty DPM a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu ve srovnání oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem.

Protokol o zkoušce

37. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

- identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

- jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),
- zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

- zdroj myši z kmene CBA,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet a věk zvířat,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),
- použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,
- podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),
- podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,
- metody měření toxicity,
- kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,
- údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,
- údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin zkoušených v dotyčné laboratoři,
- pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

- hmotnost jednotlivých myši na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,
- u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,
- tabulka hodnot DPM a hodnot SI od jednotlivých myši (individuální přístup) nebo průměrných/mediánových hodnot (sdružený přístup) za každou exponovanou skupinu,

- průměrná hodnota DPM na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehých hodnot za každou exponovanou skupinu při použití individuálního přístupu,
- vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin při použití individuálního přístupu,
- závislost odezvy na dávce,
- případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node a. s.say; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165–169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node a. s.say: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node a. s.say: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node a. s.say: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node a. s.say: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for a. s.sessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node a. s.say: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49–59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258–273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274–286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249–257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281–284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>].
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICE-ATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarq.pdf].
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>].
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. K dispozici na adrese: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm].
- (37) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Dodatek 1

Standardy funkčnosti k posouzení navrhovaných podobných nebo modifikovaných zkušebních metod LLNA pro zjišťování senzibilizace kůže

ÚVOD

1. Účelem standardů funkčnosti je stanovit základ, podle něhož lze určit, zda nové zkušební metody, a to jak chráněné (chráněné autorskými právy, chráněné ochrannými známkami, registrované), tak nechráněné, mají dostatečnou přesnost a spolehlivost pro konkrétní zkušební účely. Tyto standardy funkčnosti, založené na validovaných a uznávaných zkušebních metodách, lze používat k hodnocení spolehlivosti a přesnosti jiných podobných metod (hovorově označovaných jako zkoušky typu „me-too“), které jsou založeny na podobných vědeckých zásadách a měří nebo predikují tentýž biologický nebo toxický účinek (14).
2. Před přijetím modifikovaných metod (tzn. navrhovaných možných vylepšení schválené zkušební metody) je třeba provést posouzení, které určí dopad navrhovaných změn na funkčnost zkoušky a také míru, v jaké tyto změny ovlivňují údaje, jež jsou k dispozici pro další složky procesu validace. V závislosti na počtu a povaze navrhovaných změn, na výsledných údajích a podkladech pro tyto změny by měly být navrhované metody podrobeny buď témuž procesu validace, jaký je stanoven pro novou zkušební metodu, nebo případně omezenému posouzení spolehlivosti a relevantnosti za použití stávajících standardů funkčnosti (14).
3. Podobné nebo modifikované metody navržené k použití v rámci této ZM by měly být za účelem zjištění jejich spolehlivosti a přesnosti vyhodnoceny za použití chemických látek, které zastupují celou škálu výsledků zkoušky LLNA. Aby se zabránilo neoprávněnému využívání zvířat, důrazně se doporučuje, aby vývojoví pracovníci, kteří model koncipují, konzultovali příslušné orgány před zahájením validačních studií v souladu se standardy funkčnosti a pokyny uvedenými v této ZM.
4. Tyto standardy funkčnosti jsou založeny na harmonizovaných standardech funkčnosti vypracovaných výběrem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) pro posuzování validity podobných nebo modifikovaných verzí metody LLNA. Standardy funkčnosti jsou tvořeny zásadními složkami zkušební metody, doporučenými srovnávacími látkami a požadavky na přesnost a spolehlivost, jež by navrhovaná metoda měla splňovat nebo převyšovat.

I. Zásadní složky zkušební metody

5. Aby se zajistilo, že podobná nebo modifikovaná metoda LLNA je funkčně a mechanicky analogická s metodou LLNA a měří tentýž biologický účinek, měl by protokol zkušební metody obsahovat tyto složky:

- zkoušená látka se myši aplikuje lokálně na obě uši,
- proliferace lymfocytů by se měla měřit v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky,
- proliferace lymfocytů by se měla měřit během indukční fáze senzibilizace kůže,
- u zkoušených látek by se měla nejvyšší zvolená dávka rovnat maximální koncentraci, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myši. U pozitivních srovnávacích látek by měla být nejvyšší dávka alespoň tak vysoká jako hodnoty EC3 odpovídající srovnávací látky pro metodu LLNA (viz tabulka 1), aniž by vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myši,
- v každé studii by měly být zahrnuty souběžné kontroly s vehikulem a případně by se měla použít také souběžná pozitivní kontrola,
- na každou dávkovou skupinu by se měla použít alespoň čtyři zvířata,
- lze shromažďovat údaje za jednotlivá zvířata nebo souhrnné údaje.

Není-li některé z těchto kritérií splněno, potom nelze tyto standardy funkčnosti k validaci podobné nebo modifikované metody použít.

II. Minimální seznam srovnávacích látek

6. Harmonizované standardy funkčnosti vypracované výborem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) uvádějí 18 minimálních srovnávacích látek, které by se měly používat, a čtyři volitelné srovnávací látky (tzn. látky, které v rámci metody LLNA poskytují buď falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky ve srovnání s výsledky zkoušek na lidech a na morčatech (podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13), a proto umožňují prokázat stejnou nebo lepší funkčnost než metoda LLNA) uvedené ve standardech funkčnosti pro metodu LLNA. Kritéria výběru pro určení těchto chemických látek byla následující:

- srovnávací látky uvedené v seznamu zastupovaly druhy látek, u nichž se zpravidla zjišťuje jejich potenciál způsobovat senzibilizaci kůže a řadu reakcí, které lze měřit nebo predikovat pomocí metody LLNA,
- látky měly jasně definovanou chemickou strukturu,
- pro každou látku byly k dispozici údaje ze zkoušek na morčatech za použití metody LLNA (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) a (pokud možno) údaje ze zkoušek na lidech a
- látky byly snadno dostupné z komerčního zdroje.

Doporučené srovnávací látky jsou uvedeny v tabulce 1. Studie za použití navrhovaných srovnávacích látek by se měly hodnotit ve vehikulu, s nímž jsou uvedeny v tabulce 1. V situacích, kdy některá uvedená látka nemusí být k dispozici, lze při odpovídající zdůvodnění použít jiné látky, které splňují uvedená kritéria výběru.

Tabulka 1

Doporučené Srovnávací látky pro standardy FUNKčnosti k metodě LLNA

Číslo	Chemické látky (1)	Číslo CAS	Skup.	Veh. (2)	EC3 (v %) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
1	5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	kap.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	pev.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	benzen-1,4-diamin	106-50-3	pev.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	pev.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenol	97-54-1	kap.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-sulfanylbenzothiazol	149-30-4	pev.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	kap.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	kap.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenol	97-53-0	kap.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenyl-benzoát	93-99-2	pev.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	3-fenyl-propan-2-ol	104-54-1	pev.	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	pev.	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	methyl-methakrylát	80-62-6	kap.	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	chlorbenzen	108-90-7	kap.	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
15	propan-2-ol	67-63-0	kap.	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	kyselina mléčná	50-21-5	kap.	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
17	methyl-salicylát	119-36-8	kap.	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	kyselina salicylová	69-72-7	pev.	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Číslo	Chemické látky (1)	Číslo CAS	Skup.	Veh. (2)	EC3 (v %) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
Volitelné látky k prokázání lepší funkčnosti oproti metodě LLNA										
19	dodecyl sulfát sodný	151-21-3	pev.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1.5–17.1	+/-	+/-
20	ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kap.	MEK	28	1	14–56	NC	+/-	+/+
21	xylen	1330-20-7	kap.	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/(**)	+/-
22	chlorid nikelnatý	7718-54-9	pev.	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Zkratky: AOO = aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1); Číslo CAS = Registrační číslo Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimethylformamid; DMSO = dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlorbenzen; EC3 = odhadovaná koncentrace potřebná k dosažení hodnoty 3 indexu stimulace; HCA = 2-benzylidenoktanal; kap. = kapalina; LLNA = výsledek zkoušky s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin myši (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 429) (2); M = výsledek zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); MEK = ethyl(methyl)keton; NA = nelze použít, neboť index stimulace je menší než 3; NC = nevypočítává se, protože údaje byly získány z jediné studie; pev. = pevná látka; Skup. = skupenství; Veh. = zkušební vehikulum.

(*) Předpokládá se, že nezpůsobuje senzibilizaci u lidí, protože nebyly zjištěny žádné klinické výsledky náplastového testu, není obsažen v sadě zkoušených náplastových alergenů a nebyly zjištěny žádné případové zprávy o senzibilizaci u lidí.

(**) Výsledky zkoušek na morčatech nejsou k dispozici.

(1) Chemické látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

(2) Vzhledem k tomu, že různá vehikula mohou nepříznivě ovlivňovat funkčnost metody LLNA, by se mělo pro každou srovnávací látku používat doporučené vehikulum (24) (32).

(3) Průměrná hodnota, pokud byla k dispozici více než jedna hodnota EC3. U látek s negativním výsledkem (tzn. jejichž hodnota indexu stimulace je menší než 3; je uvedena nejvyšší zkoušená koncentrace).

(4) Počet studií LLNA, ze kterých byly získány příslušné údaje.

(5) Dostupný na trhu pod názvem Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), což je směs CMI a MI v poměru 3:1. Relativní koncentrace každé složky se pohybují v rozsahu od 1,1 % do 1,25 % (CMI), respektive od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivními složkami jsou hořečnaté soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan mědnatý (0,15 % až 0,17 %), přičemž zbytek je tvořen 74 % až 77 % vody. Přípravek Kathon CG je snadno dostupný od společností Sigma-Aldrich a Rohm & Haas (nyní Dow Chemical Corporation).

III. Definované požadavky na spolehlivost a přesnost

7. Přesnost podobné nebo modifikované metody LLNA by při vyhodnocení za pomoci 18 minimálních srovnávacích látek, které se mají používat, měla být stejná nebo vyšší, než je uvedeno ve standardech funkčnosti metody LLNA. Nová nebo modifikovaná metoda by měla vést ke správnému zařazení zkoušené látky na základě rozhodnutí typu „ano/ne“. Je však možné, že za použití nové nebo modifikované metody nebudou správně zařazeny všechny minimální srovnávací látky, které by se měly používat. Pokud by byla například chybně zařazena jedna ze slabě senzibilizujících látek, je možno zvážit zdůvodnění chybného zařazení a vhodné doplňující údaje (např. výsledky zkoušek, které zajišťují správné zařazení jiných látek s fyzikálními, chemickými a senzibilizujícími vlastnostmi podobnými vlastnostem chybně zařazené srovnávací látky) k prokázání odpovídající funkčnosti dotyčné metody. Za takových okolností by se stav validace nové nebo modifikované zkušební metody LLNA posuzoval případ od případu.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

8. Za účelem zjištění vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti by se měla nová nebo modifikovaná metoda LLNA posoudit za použití senzibilizující látky, jejíž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Proto jsou standardy funkčnosti metody LLNA založeny na variabilitě výsledků z opakovaných zkoušek 2-benzylidenoktanalu (HCA). Pro posouzení vnitrolaboratorní spolehlivosti je nutno odvodit hodnoty odhadované prahové koncentrace (EC_t) pro HCA při čtyřech různých příležitostech s prodloužením alespoň jednoho týdne mezi jednotlivými zkouškami. Přijatelnou vnitrolaboratorní reprodukovatelnost indikuje schopnost laboratoře získat v každé zkoušce HCA hodnoty EC_t v rozmezí od 5 % do 20 %, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty EC₃ stanovené pro HCA (10 %) při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

9. Mezilaboratorní reprodukovatelnost nové nebo modifikované metody LLNA by se měla posoudit za použití dvou senzibilizujících látek, jejichž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Standardy funkčnosti metody LLNA jsou založeny na variabilitě výsledků zkoušek HCA a 1-chlor-2,4-dinitrochlorbenzenu (DNCB) v různých laboratořích. Hodnoty EC_t by měly být odvozeny nezávisle na základě jedné studie provedené nejméně ve třech různých laboratořích. Aby byla prokázána přijatelná mezilaboratorní reprodukovatelnost, měla by každá laboratoř získat hodnoty EC_t v rozsahu od 5 % do 20 % pro HCA a v rozsahu od 0,025 % do 0,1 % pro DNCB, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty koncentrací EC₃ stanovené pro HCA (10 %) a DNCB (0,05 %), při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

Dodatek 2

Definice

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (14).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Odhadovaná prahová koncentrace (EC_t): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebná pro dosažení takové hodnoty indexu stimulace, která svědčí o pozitivní odezvě.

Odhadovaná koncentrace tří (EC₃): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebné pro dosažení hodnoty tří indexu stimulace.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (14).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu.

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro zkušební metodu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Taková zkušební metoda by byla kandidátem pro dodatečnou validaci. Používá se namísto podobné zkušební metody (14).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznaček, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je funkčně a mechanicky podobná. Patří mezi ně i) zásadní složky zkušební metody, ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (14).

Chráněná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž je výroba a distribuce omezena patenty, autorskými právy, ochrannými známkami apod.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Srovnávací látky: Chemické látky zvolené k použití při procesu validace, pro něž jsou již známy odezvy v rámci zkušebního systému *in vitro* nebo *in vivo* nebo odezvy u biologického druhu, který je předmětem zájmu daného zkoumání. Tyto chemické látky by měly být reprezentativními zástupci tříd chemických látek, u nichž se předpokládá používání dotyčné zkušební metody, a měly by představovat celou škálu reakcí, jež lze očekávat u chemických látek, pro něž se může zkušební metoda používat, od silné přes slabou až po negativní odezvu. Pro jednotlivé fáze procesu validace a pro různé zkušební metody a různá použití zkoušek mohou být potřebné rozdílné sady srovnávacích látek (14).

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (14).

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (14).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenů, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (14).“

2. Kapitola B.46 se nahrazuje tímto:

„B.46. DRÁŽDĚNÍ KŮŽE IN VITRO: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

ÚVOD

1. Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky v délce 4 hodin (jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (1) (3)). Tato zkušební metoda poskytuje postup *in vitro*, který lze použít k určení nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látek a směsí) patřících v rámci systému GHS OSN a podle výše uvedeného nařízení EU o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP) do kategorie 2 (1) (2) (3). V Evropské unii a dalších oblastech, které nepřijaly volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN (slabě dráždivé látky), se může tato ZM rovněž používat k identifikaci nezatříděných látek, tzn. látek označovaných v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“ (1) (3). Tuto ZM lze používat k určení dráždivých účinků chemických látek na kůži jakožto samostatnou zkoušku nahrazující zkoušky dráždění kůže *in vivo* v rámci strategie odstupňovaného zkoušení (4 a kapitola B.4 této přílohy).

2. Hodnocení dráždění kůže obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat (zkušební metodika OECD č. 404; kapitola B.4 této přílohy) (4). V souvislosti s ohledy na dobré životní podmínky zvířat byla metoda podle kapitoly B.4 v roce 2004 přepracována, aby umožňovala určit poleptání/dráždění kůže uplatněním strategie odstupňovaného zkoušení za použití validovaných metod *in vitro* a *ex vivo*, takže lze zabránit bolesti a utrpení zvířat. Tři validované zkušební metody *in vitro* byly přijaty jako zkušební metodiky OECD č. 430, 431 a 435 (5) (6) (7) a dvě z nich jako kapitoly B.40a B.40 a této přílohy a mají se používat pro tu část strategie odstupňovaného zkoušení podle kapitoly B.4 nebo zkušební metodika OECD č. 404, která se týká poleptání (4).
3. Tato ZM se týká ukazatelů dráždění kůže z hlediska lidského zdraví. Je založena na použití rekonstruované lidské epidermis, která svým celkovým uspořádáním (použitím netransformovaných keratinocytů získaných z lidské epidermis jakožto zdroje buněk, a použitím reprezentativní tkáně a cytoarchitektury) věrně napodobuje biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. epidermis. Tato ZM rovněž obsahuje sadu standardů funkčnosti (Příloha 2) pro posuzování podobných a modifikovaných metod založených na použití rekonstruované lidské epidermis vyvinutou Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (EC-ECVAM) (8), v souladu se zásadami uvedenými v Pokynu OECD č. 34 (9).
4. K dispozici jsou tři ověřené metody, které se drží této ZM. Pro zkušební metodu *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis, komerčně dostupné jako EpiSkinTM, (označenou jako validovaná referenční metoda – VRM) byly provedeny prevalidační, optimalizační a validační studie (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Dvě další komerčně dostupné metody *in vitro* pro zkoušení dráždění kůže za použití rekonstruované lidské epidermis vykazují podle validace na základě standardů funkčnosti podobné výsledky jako VRM (21). Jedná se o metody EpiDermTM SIT (EPI-200) a SkinEthicTM RHE (22).
5. Nežli lze pro regulační účely použít navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkoušku *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis – jinou než VRM a zkušební metody EpiDermTM SIT (EPI-200) nebo SkinEthicTM RHE – je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistilo, že je lze považovat za srovnatelné s odpovídajícími ukazateli VRM v souladu se standardy funkčnosti stanovenými v této ZM (dodatek 2). Kromě toho se doporučuje před zahájením vývoje a validace podobné nebo modifikované metody *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis a jejím předložením k přijetí regulačním orgánem prostudovat si vysvětlující dokument OECD o zkoumání dráždění kůže *in vitro* (23).

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Jak prokazuje validační studie (16), omezením této ZM je to, že neumožňuje zatřídění chemických látek do volitelné kategorie 3 v rámci systému GHS OSN (slabě dráždivé látky) (1). Pokud se tato ZM používá jako částečná náhradní zkouška, může být nezbytné následné testování *in vivo*, aby bylo možno plně charakterizovat potenciál látky dráždit kůži (4 a kapitola B.4 této přílohy). Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.
8. Tato ZM se týká té části strategie odstupňovaného zkoušení poleptání nebo dráždění kůže podle kapitoly B.4 (zkušební metodika OECD č. 404), která spočívá ve zkoušce dráždění kůže *in vitro* (4). Jelikož tato ZM neposkytuje odpovídající informace o poleptání kůže, je třeba poznamenat, že kapitola B.40a (zkušební metodika OECD č. 431) o poleptání kůže je založena na tomtéž zkušební systému za použití rekonstruované lidské epidermis, i když podle jiného protokolu (kapitola B.40a). Tato metoda je založena na modelech rekonstruované lidské epidermis s použitím lidských keratinocytů, které proto představují cílový orgán *in vitro* zájmového biologického druhu. Kromě toho se přímo týká prvního stupně zánětlivé kaskády/mechanismu účinku (poškození buněk a poškození tkání vedoucí ke vzniku lokalizovaného traumatu), k němuž dochází při podráždění *in vivo*. Při validaci této ZM byla testována široká škála chemických látek a empirická databáze validační studie obsahuje celkem 58 látek (16) (18) (23). Týká se to pevných látek, kapalin, polotuhých látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by se před aplikací měly pokud možno rozmělnit do podoby jemného prášku; žádná další předběžná úprava vzorku není nutná. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny (24). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná ZM zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje. Je třeba také poznamenat, že velmi barevné chemické látky mohou ovlivnit měření životaschopnosti buněk, a je proto za účelem korekcí nutno použít přízpusobené kontroly (viz odstavce 24 až 26).
9. U zkoušené látky s jednoznačným zatříděním by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití tří tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši $50 \pm 5 \%$, by se mělo zvážit druhý provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské epidermis. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstvého *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.

11. Chemicky vyvolané podráždění kůže, které se projevuje zarudnutím (erytém) a otokem (edém), je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím látky skrze *stratum corneum* a poškozením pod ním ležících vrstev keratinocytů. Z umírajících keratinocytů se uvolňují mediátory, které zahajují zánětlivou kaskádu, jež působí na buňky v *dermis*, zejména na stromatické a endoteliální buňky. Jedná se o rozšíření a zvýšení propustnosti endoteliálních buněk, při němž vzniká pozorovaný erytém a edém (24). Metody založené na použití rekonstruované lidské epidermis měří počáteční události kaskády.
12. Životaschopnost buněk modelů rekonstruované lidské epidermis se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, číslo CAS 298-93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (25). Dráždivé látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. $\leq 50\%$ pro dráždivé látky patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2). V závislosti na právním rámci, v němž se výsledky této ZM používají, lze chemické látky, při jejichž použití životaschopnost buněk přesahuje stanovenou prahovou úroveň, považovat za nedráždivé (tzn. $> 50\%$, „Bez kategorie“).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

13. Před zahájením běžného používání některé z těchto tří validovaných metod, které se drží této ZM, by měly laboratoře prokázat svoji technickou způsobilost za použití deseti srovnávacích látek uvedených v tabulce 1. V případě podobných metod vyvinutých podle této ZM nebo v případě modifikací kterékoli ze tří validovaných metod je nutno splnit požadavky standardů funkčnosti uvedené v Příloze 2 této ZM, nežli lze metodu začít používat pro účely regulačního zkoušení.
14. V rámci prokazování způsobilosti se doporučuje, aby uživatel po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřil bariérové vlastnosti tkání uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je metoda úspěšně zavedena a je prokázána způsobilost správně tuto metodu používat, není nutno běžně provádět takové ověřování. Při běžném používání metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

Tabulka 1

Srovnávací látky ⁽¹⁾

Chemická látka	Číslo CAS	Skóre <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Skupenství	Kategorie podle GHS OSN/ nařízení CLP EU
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	pevné	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	kapalné	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	1	pevné	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kapalné	Bez kategorie (Volitelná kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kapalné	Bez kategorie (Volitelná kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	kapalné	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	kapalné	Kat. 2
hydroxid sodný (5 % vod.)	1310-58-3	3	kapalné	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	3,3	pevné	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	kapalné	Kat. 2

⁽¹⁾ Tyto srovnávací látky jsou podmnožinou srovnávacích látek použitých ve validační studii.

⁽²⁾ Skóre *in vivo* podle kapitoly B.4 a zkušební metodiky OECD č. 404 (4).

⁽³⁾ rámci této zkušební metody se látka patřící podle systému GHS OSN do volitelné kategorie 3 (slabě dráždivé látky) (1) považují za látky s označením „Bez kategorie“.

⁽⁴⁾ Podle nařízení CLP Evropské unie nelze volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN použít.

POSTUP

15. Následuje popis složek a postupů zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis při hodnocení dráždění kůže. Měl by být rekonstruován model lidské epidermis a lze jej rovněž připravit interně nebo získat na trhu. K dispozici jsou standardní prováděcí postupy pro metody EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) a SkinEthicTM RHE (26) (27) (28). Zkoušení by se mělo provádět následujícím způsobem:

Složky zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis

Všeobecné podmínky

16. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkčním *stratum corneum* by měly být přítomny několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Funkce bariéry by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkáně o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET₅₀) po aplikaci látky markeru v pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské epidermis by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské epidermis by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

Funkční podmínky

Životaschopnost

17. K určení míry životaschopnosti se používá zkouška MTT (25). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Optická hustota (OD) samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro hodnoty OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody pro určení dráždění kůže) stanoví subjekt, který vyvinul nebo dodává model rekonstruované lidské epidermis, a rozsahy přijatelnosti pro 3 validované metody jsou uvedeny v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti) po dobu trvání zkušební doby expozice.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Bariérová funkce

18. *Stratum corneum* a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. SDS nebo Triton X-100, podle odhadu na základě hodnoty IC₅₀ nebo ET₅₀ (tabulka 3).

Morfologie

19. Mělo by se provést histologické vyšetření modelu rekonstruované lidské epidermis, které prokáže strukturu podobnou lidské *epidermis* (včetně vícevrstevného *stratum corneum*).

Reprodukovatelnost

20. Výsledky zkušební metody za použití pozitivní kontrolní látky a negativních kontrol by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

21. Subjekt, který vyvinul nebo dodává model rekonstruované lidské epidermis, by měl zajistit a prokázat, že každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 17), *bariérové funkce* (odstavec 18) a *morfologie* (odstavec 19). Tyto údaje by měly být poskytovány uživateli metody, aby je mohli uvést v protokolu o zkoušce. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} je zapotřebí zjistit u subjektu, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává (nebo u zkoušejícího, pokud se používá vlastní model). Pro spolehlivou predikci zařazení zkoušené látky do dráždivosti mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití náležitých tkání. Jako příklad jsou v tabulce 3 uvedeny rozsahy přijatelnosti pro tři validované referenční metody.

Tabulka 3

Příklady kritérií kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin TM (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm TM SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hod.}$
SkinEthic TM RHE (1 % Triton X-100)(28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ hod.}$

Aplikace zkoušené látky a kontrolní látky

22. Pro každou zkoušenou látku a pro kontroly by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň tři replikáty. V případě kapalných a pevných látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkušební látky, aby rovnoměrně pokryla povrch *epidermis*, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. že je třeba použít nejméně $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ nebo $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. V případě pevných látek je nutno povrch *epidermis* před nanesením zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené látky s povrchem *epidermis*. Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Na konci expoziční doby je nutno zkušební látku pečlivě spláchnout z povrchu *epidermis* vodným pufrům nebo 0,9 % roztokem NaCl. V závislosti na tom, která ze tří validovaných metod s použitím rekonstruované lidské epidermis se použije, se doba expozice pohybuje v rozmezí od 15 do 60 minut a teplota inkubace v rozmezí od 20 do 37 °C. Tyto expoziční doby a teploty jsou optimalizovány pro každou metodu s použitím rekonstruované lidské epidermis a představují různé inherentní vlastnosti dotyčných metod. Podrobnosti viz standardní prováděcí postupy jednotlivých metod (26) (27) (28).
23. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžně negativní kontroly a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativní kontroly), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí dosavadních hodnot přijatelnosti. Navrhovanou pozitivní kontrolou je 5 % vodný SDS. Navrhovanými látkami pro negativní kontrolu jsou voda a fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

Měření životaschopnosti buněk

24. Nejdůležitějším prvkem zkušební postupu je to, že se měření životaschopnosti neprovádí okamžitě po expozici působení zkoušených látek, ale až po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření tkání opláchnutých v čerstvém médiu. Tato doba umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i vznik jasných známek cytotoxických účinků. Během optimalizační fáze zkoušky (11) (12) (13) (14) (15) se jako optimální ukázala 42 hodinová inkubační doba po ošetření.
25. Zkouška MTT je kvantitativní validovaná metoda, která by se měla používat k měření životaschopnosti buněk podle této ZM. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové soustavy. Vzorek tkáně se na dobu 3 hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3 až 1 mg/ml). Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změní určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše $\pm 30 \text{ nm}$.
26. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT mohou zkoušku ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti (protože zkoušená látka může zabránit vybarvení, změnit zabarvení v opačné, nebo naopak může vybarvení způsobit). K tomu může dojít v případě, že se určitá zkoušená látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*. Jestliže zkoušená látka působí přímo na MTT (tzn. že jej redukuje), má přirozené zabarvení nebo se zabarví během svého působení na tkáň, pak jsou ke zjištění interference zkoušené látky s postupem měření životaschopnosti buněk a ke korekci této interference zapotřebí dodatečné kontroly. Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivem, naleznete ve standardních prováděcích postupech výše uvedených tří validovaných metod (26) (27) (28).

Kritéria přijatelnosti

27. U každé metody s použitím platných šarží modelu rekonstruované lidské epidermis (viz odstavec 21) by tkáň ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle protokolu zkoušky. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáň ošetřené pozitivní kontrolou, tj. 5 % vodným SDS, měly odrážet svou schopnost reagovat na dráždivou látku v podmínkách ZM (26) (27) (28). Je nutno vymezit související vhodné hodnoty variability mezi tkáňovými replikáty (např. pokud se používají standardní odchylky (SD), měly by být v rozmezí jednostranného 95 % tolerančního intervalu vypočteného z dosavadních údajů; u VRM by měla být $SD < 18 \%$).

Interpretace výsledků a predikční model

28. Hodnoty OD získané s každou zkoušenou látkou lze použít k výpočtu procentuálního podílu životaschopnosti buněk normalizovaného podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Je zapotřebí jasně vymezit, zdokumentovat a v případě potřeby prokázat mezní hodnotu procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišující dráždivou látku od nezatříděných zkoušených látek a statistický postup (statistické postupy) použité k vyhodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek. Mezní hodnoty pro predikci dráždění jsou uvedeny níže:

- Zkoušená látka je považována za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP Evropské unie, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna (\leq) 50 %.
- V závislosti na právním rámci, v němž se výsledky této ZM používají, lze zkoušenou látku považovat za nedráždivou pro kůži v souladu s označením 'Bez kategorie' v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP Evropské unie, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření větší než ($>$) 50 %.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

29. Za každé provedení zkoušky by se údaje získané za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítané údaje procentuální životaschopnosti buněk pro každou zkoušenou látku, a to včetně jejího zatřídění) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Navíc je za každé provedení zkoušky nutno vykázat průměr \pm standardní odchylku. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou látku.

Protokol o zkoušce

30. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

- chemický název (chemické názvy), například název CAS a číslo CAS, název a číslo podle klasifikace ES, jsou-li známy,
- čistota a složení látky (v hmotnostních procentech),
- fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provádění studie (např. skupenství, stabilita, těkavost, pH a rozpustnost ve vodě, jsou-li známy),
- případné ošetření zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřívání, mletí),
- podmínky uchovávání.

Odůvodnění použitého modelu rekonstruované lidské epidermis a protokolu

Zkušební podmínky:

- použitý buněčný systém,
- úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) životaschopnost,
 - ii) bariérovou funkci,
 - iii) morfologii,
 - iv) reprodukovatelnost a předvídatelnost,
 - v) kontroly kvality modelu,
- podrobnosti použitého zkušební postupu,
- použité zkušební dávky, doba expozice a doba inkubace po ošetření,
- popis jakýchkoli úprav zkušební postupu,

- odkaz na dosavadní údaje modelu. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na dosavadní údaje o šaržích,
 - ii) přijatelnost hodnot pozitivních a negativních kontrol s odkazem na průměry a rozsahy pozitivních a negativních kontrol,
- popis použitých kritérií hodnocení včetně odůvodnění volby mezní hodnoty pro predikční model,
- odkaz na dosavadní údaje kontrol.

Výsledky:

- údaje pro jednotlivé zkoušené látky za každé provedení zkoušky a měření každého replikátu, uspořádané do podoby tabulek,
- přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukuje MTT, a/nebo pro zbarvující zkoušené látky,
- popis ostatních pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků

Závěr

LITERATURA

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. K dispozici na adrese: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html].
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the 'Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards', issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (3) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351–367.

- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351–358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231–243.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55–63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min. – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, Úř. věst. L 225, 21.8.2001, s. 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1–4.

- (32) Jírová, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlová, K., Bendová, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandarova, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109–116.

Dodatek 1

Definice

Přesnost: Blížkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Životaschopnost buněk: Parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené hodnotě a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Soulad: Je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategoričké výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se používá namísto výrazu „přesnost“ a je vymezen jako podíl všech zkoušených látek, které jsou správně zaříděny jako pozitivní nebo negativní (9).

ET₅₀: Tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci látky markeru v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC₅₀.

Nařízení CLP Evropské unie (nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí): Toto nařízení provádí v Evropské unii (EU) systém GHS OSN pro klasifikace a označování chemikálií (látek a směsí) (3).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek vypracovaný Organizací spojených národů (OSN)): Systém navrhuje klasifikaci chemikálií (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a řeší příslušné komunikační prvky, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, za účelem poskytování informací o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravníků, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

IC₅₀: Tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET₅₀.

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanášené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro zkušební metodu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Taková zkušební metoda by byla kandidátem pro dodatečnou validaci. Používá se namísto podobné zkušební metody (9).

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně i) zásadní složky zkušební metody, ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (9).

Srovnávací látky: Chemické látky zvolené k použití při procesu validace, pro něž jsou již známy odezvy v rámci zkušebního systému *in vitro* nebo *in vivo* nebo odezvy u biologického druhu, který je předmětem zájmu daného zkoumání. Tyto chemické látky by měly být reprezentativními zástupci tříd chemických látek, u nichž se předpokládá používání dotyčné zkušební metody, a měly by představovat celou škálu reakcí, jež lze očekávat u chemických látek, pro něž se může zkušební metoda používat, od silné přes slabou až po negativní odezvu. Pro jednotlivé fáze procesu validace a pro různé zkušební metody a různá použití zkoušek mohou být potřebné rozdílné sady srovnávacích látek (9).

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží ke určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené látky (9).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Dráždění kůže: Vyvolání reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky po dobu až 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající neimunogenní reakce, která se objevuje krátce po stimulaci (29). Její hlavní charakteristikou je reverzibilní povaha zahrnující zánětlivé reakce a většinu charakteristických klinických příznaků podráždění (erytém, edém, svědění a bolest) souvisejících se zánětlivým procesem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Strategie odstupňovaného zkoušení: Zkoušení, které využívá metody zkoušení postupným způsobem; zkušební metody se na každé následující úrovni volí na základě výsledků získaných na předchozí úrovni testování (9).

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Dodatek 2

Standardy funkčnosti k posouzení navrhovaných podobných nebo modifikovaných metod pro zkoušení dráždění kůže *in vitro* za použití rekonstruované lidské epidermis

ÚVOD

1. Účelem standardů funkčnosti je stanovit základ, podle něhož lze určit, zda nové metody, a to jak chráněné (chráněné autorskými právy, chráněné ochrannými známkami, registrované), tak nechráněné, mají dostatečnou přesnost a spolehlivost pro konkrétní zkušební účely. Tyto standardy funkčnosti, založené na validovaných a uznávaných metodách, lze používat k hodnocení spolehlivosti a přesnosti jiných podobných metod (hovorově označovaných jako zkoušky typu „me-too“), které jsou založeny na podobných vědeckých zásadách a měří nebo predikují tentýž biologický nebo toxický účinek (9).
2. Před přijetím modifikovaných metod (tzn. navrhovaných možných vylepšení schválené zkušební metody) je třeba provést posouzení, které určí dopad navrhovaných změn na funkčnost zkoušky a také míru, v jaké tyto změny ovlivňují údaje, jež jsou k dispozici pro další složky procesu validace. V závislosti na počtu a povaze navrhovaných změn, na výsledných údajích a podkladech pro tyto změny by měly být navrhované metody podrobeny buď témuž procesu validace, jaký je stanoven pro novou zkušební metodu, nebo případně omezenému posouzení spolehlivosti a relevantnosti za použití stávajících standardů funkčnosti (9).
3. Podobné metody (typu „me-too“) nebo modifikované metody odvozené od kterékoli ze tří validovaných metod [EpiSkinTM (validovaná referenční metoda – VRM), EpiDermTM SIT (EPI-200) a SkinEthicTM RHE] navrhované k použití v rámci této ZM je nutno vyhodnotit, aby se stanovila jejich spolehlivost a přesnost za použití látek zastupujících celý rozsah Draizeho škály dráždivosti. Při hodnocení za použití 20 srovnávacích látek doporučených ve standardech funkčnosti (tabulka 1) by navrhované podobné nebo modifikované metody měly mít hodnoty spolehlivosti a přesnosti, které jsou srovnatelné nebo lepší než hodnoty získané při použití VRM (tabulka 2) (16). Hodnoty spolehlivosti a přesnosti, jichž by mělo být dosaženo, jsou uvedeny v odstavcích 8 až 12 tohoto dodatku. Seznam srovnávacích látek obsahuje nezatříděné látky (označované v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“) a zatříděné látky (patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2) (1), které zastupují různé třídy chemických látek, aby bylo možno spolehlivost a přesnost (citlivost, specifičnost a celkovou přesnost) navrhované metody porovnat s odpovídajícími hodnotami VRM. Spolehlivost metody, jakož i její schopnost správně určit dráždivé chemické látky patřící v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2 a – v závislosti na regulačním rámci, pro který jsou získávané údaje určeny – také její schopnost správně určit látky označované v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“ je třeba stanovit ještě před jejím použitím pro zkoušení nových zkušebních látek.

4. Tyto standardy funkčnosti jsou založeny na standardech funkčnosti vypracovaných střediskem EC-ECVAM (8), aktualizovaných v souladu se systémy klasifikace a značení látek GHS OSN a CLP Evropské unie (1) (3). Původní standardy funkčnosti byly vymezeny po provedení validační studie (21) a byly založeny na klasifikačním systému EU stanoveném ve směrnici Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek⁽¹⁾. Vzhledem k přijetí systému GHS OSN pro klasifikaci a označování látek i v rámci EU (nařízení CLP Evropské unie) (3), k němuž došlo v době mezi provedením validační studie a vypracováním této ZM, byly standardy funkčnosti aktualizovány (8). Tato aktualizace spočívá především ve změnách i) sady srovnávacích látek uvedených ve standardech funkčnosti a ii) stanovených hodnot spolehlivosti a přesnosti (2) (23).

STANDARDY FUNKČNOSTI PRO ZKUŠEBNÍ METODY *IN VITRO* POUŽÍVANÉ KE ZKOUŠKÁM DRÁŽDĚNÍ KŮŽE ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

5. Standardy funkčnosti jsou tvořeny těmito třemi prvky (9):

- I. Zásadní složky zkušební metody;
- II. Minimální seznam srovnávacích látek;
- III. Definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti.

I. Zásadní složky zkušební metody

6. Patří mezi ně zásadní strukturní, funkční a procedurální prvky validované metody, které by měly být obsaženy v protokolu navrhované, mechanicky a funkčně podobné nebo modifikované metody. Tyto složky představují jedinečné vlastnosti metody, nejdůležitější procedurální podrobnosti a opatření pro kontrolu kvality. Dodržování zásadních složek zkušební metody pomůže zajistit, aby navrhovaná podobná nebo modifikovaná metoda byla založena na stejných pojmech jako odpovídající VRM (9). Základní součásti zkušební metody jsou podrobně popsány v odstavcích 16 až 21 ZM a zkušební by se mělo provádět v souladu s:

- všeobecnými podmínkami (odstavec 16),
- funkčními podmínkami, mezi něž patří:
 - životaschopnost buněk (odstavec 17),
 - bariérová funkce (odstavec 18),
 - morfologie (odstavec 19),
 - reprodukovatelnost (odstavec 20) a
 - kontrola kvality (odstavec 21).

II. Minimální seznam srovnávacích látek

7. Srovnávací látky slouží k rozhodnutí, zda navrhovaná podobná nebo modifikovaná metoda, u níž je prokázáno, že je strukturálně a funkčně dostatečně podobná validované referenční metodě (VRM), nebo která představuje drobnou úpravu jedné ze tří validovaných referenčních metod, má srovnatelnou nebo lepší spolehlivost a přesnost nežli VRM (2) (8) (16) (23). Seznam 20 doporučených srovnávacích látek uvedený v tabulce 1 obsahuje chemické látky, které zastupují různé třídy chemických látek (tzn. kategorie chemických látek na základě funkčních skupin) a jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Dražehy škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky). Tento seznam obsahuje 10 látek patřících v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie do kategorie 2 a 10 nezatříděných chemických látek, z nichž 3 jsou volitelné látky patřící v rámci systému GHS OSN do kategorie 3. V rámci této zkušební metody se látky volitelné kategorie 3 považují za látky s označením „Bez kategorie“. Chemické látky uvedené v tabulce 1 jsou vybrány z látek použitých v rámci optimalizační fáze, která následovala po prevalidaci, a ve validační studii VRM, s ohledem na chemickou funkčnost a skupenství (14) (18). Tyto srovnávací látky představují minimální počet látek, které by se měly používat k hodnocení přesnosti a spolehlivosti navrhované podobné nebo modifikované metody, ale neměly by se používat k vývoji nových metod. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze použít jiné chemické látky, u nichž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o jejich použití *in vivo*, přičemž je třeba vybírat především z chemických látek použitých v rámci optimalizační fáze, která následovala po prevalidaci, nebo ve validační studii VRM. Je-li to žádoucí, lze minimální seznam srovnávacích látek rozšířit o další látky zastupující jiné třídy chemických látek, u nichž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo*, za účelem dalšího hodnocení přesnosti navrhované metody.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 225, 21.8.2001, s. 1.

Tabulka 1

Minimální seznam srovnávacích látek ke stanovení hodnot přesnosti a spolehlivosti podobných nebo modifikovaných metod zkoušení kožní dráždivosti za použití rekonstruované lidské epidermis ⁽¹⁾

Chemická látka	Číslo CAS	Skupenství	Skóre in vivo	Kat. VRM in vitro	Kat. in vivo podle GHS OSN/CLP Evropské unie
1-brom-4-chlorbutan	6940-78-9	kapalné	0	Kat. 2	Bez kategorie
diethyl-ftalát	84-66-2	kapalné	0	Bez kategorie	Bez kategorie
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	pevné	0	Bez kategorie	Bez kategorie
allyl-fenoxyacetát	7493-74-5	kapalné	0,3	Bez kategorie	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	kapalné	0,3	Bez kategorie	Bez kategorie
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	kapalné	1	Kat. 2	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	pevné	1	Bez kategorie	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	kapalné	1,7	Bez kategorie	Bez kategorie
hexyl-salicylát	6259-76-3	kapalné	2	Bez kategorie	Bez kategorie
cinnamaldehyd	104-55-2	kapalné	2	Kat. 2	Bez kategorie (Volitelná kat. 3) ⁽³⁾
dekan-1-ol ⁽²⁾	112-30-1	kapalné	2,3	Kat. 2	Kat. 2
cyklamenaldehyd	103-95-7	kapalné	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	kapalné	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-(chloromethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-hydrochlorid	86604-75-3	pevné	2,7	Kat. 2	Kat. 2
dipropyldisulfid ⁽²⁾	629-19-6	kapalné	3	Bez kategorie	Kat. 2
hydroxid sodný (5 % vod.)	1310-58-3	kapalné	3	Kat. 2	Kat. 2
benzenthioi, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	kapalné	3,3	Kat. 2	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	pevné	3,3	Kat. 2	Kat. 2
heptanal	111-71-7	kapalné	3,4	Kat. 2	Kat. 2
tetrachlorethen	127-18-4	kapalné	4	Kat. 2	Kat. 2

⁽¹⁾ Výběr chemických látek je založen na těchto kritériích: i) látky jsou dostupné na trhu, ii) jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky), iii) mají jasně definovanou chemickou strukturu, iv) jsou představitelem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu a v) nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (jako jsou např. karcinogenní látky nebo látky toxické pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.

⁽²⁾ Chemické látky, které jsou dráždivé pro králíky, ale u nichž existují spolehlivé důkazy o tom, že jsou nedráždivé pro lidi (31) (32) (33).

⁽³⁾ V rámci systému GHS OSN, nikoli podle nařízení CLP Evropské unie.

III. Definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti

8. Pro účely stanovení spolehlivosti a relevantnosti navrhovaných podobných nebo modifikovaných metod, jež se mají přenášet mezi laboratořemi, by mělo být všech 20 srovnávacích látek uvedených v tabulce 1 odzkoušeno nejméně třemi laboratořemi. Pokud se však má navrhovaná metoda používat jen v jedné laboratoři, nebude zkoušení ve více laboratořích v rámci validace nutné. Je však nezbytné, aby byly tyto validační studie samostatně vyhodnoceny mezinárodními uznávanými validačními orgány v souladu s mezinárodními směrnici (9). V každé laboratoři by se mělo odzkoušet všech 20 srovnávacích látek ve třech samostatných provedeních zkoušky vykonaných za použití různých šarží tkáně a s dostatečným časovým odstupem. Při každém provedení zkoušky by se měl použít nejméně tři souběžně zkoušené tkáňové replikáty pro každou zkoušenou látku, negativní kontrolu a pozitivní kontrolu.
9. Hodnoty spolehlivosti a přesnosti navrhované metody by se měly vypočítat s ohledem na všechna čtyři níže uvedená kritéria dohromady, přičemž je třeba zajistit, aby se hodnoty spolehlivosti a relevantnosti vypočítávaly předem vymezeným, jednotným způsobem:
 - 1) K výpočtu variability a prediktivní schopnosti (přesnosti) metody v rámci jedné laboratoře i v rámci různých laboratoří lze použít pouze údaje z takových provedení zkoušky, která jsou součástí úplné série provedení.
 - 2) Konečné zařazení každé srovnávací látky v každé zúčastněné laboratoři by mělo vycházet z průměrné hodnoty životaschopnosti buněk v rámci různých provedení zkoušky, která jsou součástí úplné série provedení.
 - 3) K výpočtu mezilaboratorní variability metody lze použít pouze údaje získané pro chemické látky, které byly podrobeny úplné sérii provedení zkoušky ve všech zúčastněných laboratořích.
 - 4) Hodnoty přesnosti by se měly vypočítat na základě jednotlivých laboratorních predikcí získaných u 20 srovnávacích látek jednotlivými zúčastněnými laboratořemi.

V této souvislosti se **série provedení** skládá ze tří samostatných provedení zkoušky v jedné laboratoři za použití jedné zkoušené látky. **Úplnou sérií provedení** se rozumí série provedení zkoušky v jedné laboratoři za použití jedné zkoušené látky, kdy všechna tři provedení jsou platná. To znamená, že jakékoli neplatné provedení způsobí neplatnost celé série tří provedení.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

10. Hodnocení vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti by mělo ukázat 90 % nebo vyšší (\geq) shodu zařazení jednotlivých látek (do kategorie 2 v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie, respektive mezi látky s označením „Bez kategorie“), k nimž se dospělo při různých nezávislých provedeních zkoušek 20 srovnávacích látek v rámci jediné laboratoře.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

11. Hodnocení mezilaboratorní reprodukovatelnosti není zásadně důležité, jestliže se má navrhovaná metoda používat pouze v jediné laboratoři. U metod, které se mají přenášet mezi laboratořemi, by shoda zařazení jednotlivých látek (do kategorie 2 v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie, respektive mezi látky s označením „Bez kategorie“), k nimž se dospělo při různých nezávislých provedeních zkoušek 20 srovnávacích látek v rámci nejlépe alespoň tří laboratoří, měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 80 %.

Prediktivní schopnost (přesnost)

12. Přesnost (citlivost, specifická a celková přesnost) navrhované podobné nebo modifikované metody by měla být srovnatelná nebo lepší než u VRM s přihlédnutím k dalším informacím týkajícím se relevantnosti u biologického druhu, který je předmětem zájmu (Tabulka 2). Citlivost by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 80 % (2) (8) (23). Avšak další zvláštní omezení se týká citlivosti navrhované metody *in vitro*, kdy pouze dvě chemické látky patřící v rámci zkoušek *in vivo* do kategorie 2 (*dekan-1-ol* a *dipropylsulfid*) mohou být více než jednou zúčastněnou laboratoří nesprávně zařazené mezi látky „Bez kategorie“. Specifická by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 70 % (2) (8) (23). Nejsou stanovena žádná další omezení, pokud jde o specifickou navrhované metody *in vitro*, tzn. že pokud některá ze zúčastněných laboratoří může nesprávně zařadit jakékoli látky patřící v rámci zkoušek *in vivo* mezi látky „Bez kategorie“, jestliže výsledná hodnota specifické zkušební metody je v přijatelném rozsahu. Celková přesnost by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 75 % (2) (8) (23). Ačkoli citlivost VRM vypočtená pro 20 srovnávacích látek uvedených v tabulce 1 činí 90 %, definovaná minimální hodnota citlivosti požadovaná u jakékoli podobné nebo modifikované metody, která má být považována za platnou, je stanovena na 80 %, jelikož je známo, že jak *dekan-1-ol* (hraniční látka), tak *dipropylsulfid* (falešně negativní látka při použití VRM) nepůsobí u lidí dráždivě (31) (32) (33), ačkoli při zkoušce na králících byly identifikovány jakožto dráždivé látky. Jelikož jsou modely rekonstruované lidské epidermis založeny na buňkách lidského původu, mohou u těchto chemických látek predikovat, že se jedná o nedráždivé látky (označené v rámci systému GHS OSN a podle nařízení CLP Evropské unie výrazem „Bez kategorie“).

Tabulka 2

Prediktivní hodnoty citlivosti, specifčnosti a celkové přesnosti podobné nebo upravené metody nezbytné k tomu, aby byla metoda považována za platnou

Citlivost	Specifčnost	Celková přesnost
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kritéria přijatelnosti studie

13. Může se stát, že jedna nebo několik zkoušek týkajících se jedné nebo více zkoušených látek nespĺňují kritéria přijatelnosti pro zkoušené a kontrolní látky a/nebo nejsou přijatelné z jiných důvodů. Za účelem doplnění chybějících údajů je přípustné pro každou zkoušenou látku provést nejvýše dvě doplňkové zkoušky („přezkoušení“). Přesněji řečeno, jelikož v případě přezkoušení je nutno souběžně provést i zkoušky pozitivních a negativních kontrol, pro každou zkoušenou látku je možno uskutečnit nejvýše dvě doplňková provedení zkoušky.
14. Je možné, že se ani po přezkoušení nepodaří získat minimální počet tři platných provedení zkoušky pro každou srovnávací látku v každé zúčastněné laboratoři, což vede ke vzniku neúplné matice údajů. V takových případech by měla být splněna všechna tři následující kritéria, aby byly soubory údajů považovány za přijatelné:
- 1) Všechny 20 srovnávacích látek by mělo mít alespoň jednu úplnou sérii provedení zkoušky.
 - 2) V každé z nejméně tří zúčastněných laboratoří musí být dokončeno nejméně 85 % úplných sérií provedení zkoušky (pro 20 chemických látek, tzn. že v jedné laboratoři jsou povoleny nejvýše 3 neplatné série provedení zkoušky).
 - 3) Nejméně 90 % všech možných sérií provedení zkoušky z nejméně tří laboratoří musí být úplných (pro 20 chemických látek zkoušených ve 3 laboratořích, tzn. že celkem je povoleno 6 neplatných sérií provedení zkoušky).“
3. Doplňují se další kapitoly, které znějí:

„B.49. ZKOUŠKA IN VITRO NA PŘÍTOMNOST MIKROJADER V BUŇKÁCH SAVCŮ**ÚVOD**

1. Zkouška *in vitro* na přítomnost mikrojader (MNvit) je zkouška genotoxicity pro zjišťování přítomnosti mikrojader v cytoplazmě interfázových buněk. Mikrojádra mohou pocházet z acentrických fragmentů chromozomů (tzn. fragmentů, jimž chybí centromera) nebo z celých chromozomů, které nejsou při buněčném dělení schopny se ve stádiu anafáze rozejít k pólům. Zkouška zjišťuje působení klastogenních a aneugenních chemikálií (látek a směsí) (1) (2) v buňkách, které prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po expozici zkoušené látky. Tato zkušební metoda (ZM) umožňuje používat protokoly s inhibítozem polymerace aktinu, cytochalasinem B (cytoB), i bez něho. 5. Přidání cytoB před cílovou mitózou umožňuje identifikaci a selektivní analýzu četnosti výskytu mikrojader v buňkách, které prodělaly jednu mitózu, protože tyto buňky jsou dvoujaderné (3) (4). Tato ZM rovněž umožňuje použití protokolů bez blokování cytokineze, pokud existují důkazy, že analyzovaná populace buněk prodělala mitózu.
2. Kromě použití zkoušky MNvit pro identifikaci chemikálií (látek a směsí), které vyvolávají vznik mikrojader, lze informace o mechanismech poškození chromozomů a tvorbě mikrojader získat rovněž použitím blokování cytokineze, imunochemického značení kinetochorů nebo hybridizace za použití centromerických/telomerických sond (fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Postupy značení a hybridizace lze použít, pokud dojde ke zvýšené tvorbě mikrojader a zkoušející chce zjistit, zda je toto zvýšení výsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení.
3. Mikrojádra představují poškození přenesené na dceřiné buňky, zatímco chromozomové aberace zjištěné v metafázových buňkách se přenášet nemusí. Jelikož mikrojádra v interfázových buňkách lze posuzovat poměrně objektivně, laboratorní personál potřebuje pouze zjistit, zda buňky prošly dělením, či nikoli, a kolik buněk obsahuje mikrojádra. Díky tomu lze preparáty vyhodnotit poměrně rychle a analýzu lze automatizovat. Proto je praktické hodnotit při každé zkoušce tisíce namísto stovek buněk, čímž se zvyšuje výkonost této metody. A konečně, jelikož mikrojádra mohou vznikat z méně vyvinutých chromozomů, je možno zjišťovat látky, které vyvolávají aneuploidii, jež lze obtížně studovat za použití běžných zkoušek na chromozomové aberace, např. podle zkušební metodiky OECD č. 473 (kapitola B.10 této přílohy) (17). Zkouška MNvit však neumožňuje odlišit chemické látky vyvolávající polyploidii od látek vyvolávajících klastogenicitu bez speciálních postupů, jako je například metoda FISH popsaná v odstavci 2.

4. Zkouška MNvit je metoda *in vitro*, která obvykle využívá kultivované lidské buňky nebo buňky pocházející z hlodavců. Poskytuje komplexní základ pro vyšetřování potenciálu látek poškozovat chromozomy *in vitro*, protože jejím prostřednictvím lze detekovat aneugeny i klastogeny.
5. Zkouška MNvit je robustní a účinná u široké škály různých typů buněk, za přítomnosti nebo nepřítomnosti cytoB. Existuje množství údajů potvrzujících platnost zkoušky MNvit za použití různých buněčných linií pocházejících z hlodavců (CHO, V79, CHL/IU a L5178Y) a také za použití lidských lymfocytů (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Patří mezi ně zejména mezinárodní validační studie koordinované společností Société Fran aise de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) a zprávy z Mezinárodního semináre o zkoušení genotoxicity (4) (16). Dostupn údaje byly rovněž prehodnoceny v retrospektivn validační studii v rámci pstupu založeného na vážení důkazů, proveden Evropskm střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) Evropské komise, a zkušební metoda byla potvrzena jako vědecky platn vdeckm poradnm výborem ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Bylo popsáno využití lidské linie lymfoblastoidnch bunek TK6 (35), bunek HepG2 (36) (37) a primárních bunek z embryí syrského křečka (38), ačkoli nebyly použity ve validačních studiích.

DEFINICE

6. Použit definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ UVAHY

7. Zkoušky provdn *in vitro* obecn vyžadují použit exogenního zdroje metabolické aktivace, pokud nejsou buňky metabolicky kompetentn s ohledem na zkoušen látku. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*. Je také nutno zabránit vzniku podmínek, kter by vedly k uměle pozitivním výsledkům, jež neodrzej vlastn mutagenitu zkoušen látku, a kter mohou nastat působením takových faktorů, jako jsou vrazn změny pH nebo osmolality, nebo v důsledku vysokých urovn cytotoxicity (39) (40) (41). Pokud zkoušen látku zpsob p přidání změnu pH kultivačního média, je nutno hodnotu pH upravit, nejlépe pufrovnm zásobního roztoku tak, aby vschny objemy ve vsich zkoušených koncentracích a pro vschny kontroly zůstaly stejn.
8. Pro analýzu indukce vzniku mikrojaderek je nezbytn, aby proběhla mitóza v exponovaných i neexponovaných kulturách. Neinformativnj fází pro hodnocen výskytu mikrojaderek jsou buňky, kter prodělaly jednu mitózu během expozice nebo po expozici zkoušen látce.

PODSTATA ZKOUŠKY

9. Bunenn kultury lidského a savcího původu jsou vystaveny zkoušen látce za ptmnosti exogenního zdroje metabolické aktivace i bez něho, pokud ovšem nejsou použity buňky s dostatečnou schopností metabolismu. Do vsich zkoušek se zařadí soubžn kontroly s rozpouštdlem nebo vehikulem a pozitivní kontrolní látku.
10. Během nebo po expozici zkoušen látce se buňky kultivují dostatečn dlouho, aby poškození chromozomů nebo dělicího vtnka vedlo v interfázových bunkch ke vzniku mikrojaderek. Pro vyvolání aneuploidie by měla být zkoušen látku obvykle ptmna p mitóze. Zskan a obarven interfzov buňky se analyzuj na ptmnost mikrojaderek. V ideálním ppad by měla být ptmnost mikrojaderek zjstna pouze v těch bunkch, kter prodělaly mitózu během expozice zkoušen látce nebo během postexpoziční doby, pokud se používá. V kulturách, které byly ošetřeny blokátorem cytokineze, se toho dosáhne tím, že se zaznamenají pouze dvoujaderné buňky. V ppad nepřtmnosti blokátoru cytokineze je nutno prokázat, že analyzovan buňky pravdpodobn prodělaly bunenn dělení během expozice nebo po expozici zkoušen látce. U vsich protokolů je dležit prokázat, že došlo k proliferaci bunek jak v kontrolních, tak v ošetřených kulturách, a také je třeba v kulturách (nebo v paralelních kulturách), u nichž se hodnot výskyt mikrojaderek, posoudit míru cytotoxicity nebo cytotstze.

POPIS ZKOUŠKY

Preparáty

11. Lze použit kultivovan primrn lidské lymfocyty z periferní krve (5) (19) (42) (43) a celou řadu bunennch linií pocházejících z hlodavců, napklad buňky CHO, V79, CHL/IU a L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Použit jiných bunennch linií a druh by mělo být odůvodněno na základě jejich prokzan funkčnosti ve zkoušce, jak je popsáno v části ‚Kritéria přijatelnosti‘. Jelikož četnost mikrojaderek v rámci prozenho pozadí ovlivní citlivost testu, doporučuje se používat druhy bunek s nízkou, stabiln četností tvorby mikrojaderek v rámci prozenho pozadí.

12. Lidské lymfocyty z periferní krve by měly být získány od mladých (přibližně ve věku 18–35 let) zdravých nekuřáků bez jakékoli známé nedávné expozice genotoxickým látkám nebo radiaci. Pokud se společně používají buňky pocházející od více než jednoho dárce, měl by být počet dárců uveden. Četnost mikrojader se zvyšuje s věkem a tato tendence je výraznější u žen než u mužů (44), což je třeba vzít v úvahu při výběru dárcovských buněk pro společné použití.

Média a podmínky kultivace

13. Pro udržování kultur by se měla používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO₂, teplota a vlhkost). U stabilizovaných buněčných linií a kmenů by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty. Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Je třeba, aby bylo známo normální trvání buněčného cyklu při kultivačních podmínkách použitých ve zkušební laboratoři. V případě použití metody s blokováním cytokineze by se koncentrace inhibitoru cytokineze měla optimalizovat pro konkrétní typ buněk a mělo by se prokázat, že tato koncentrace poskytuje dostatečné množství dvoujaderných buněk pro vyhodnocení zkoušky.

Příprava kultur

14. Stabilizované buněčné linie a kmeny: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby před odebráním nedosáhly běžné kultury konfluence v monovrstvách a aby suspenzní kultury nedosáhly nadměrné hustoty, a inkubují se při teplotě 37 °C.
15. Lymfocyty: plná krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty se před expozicí zkoušené látky a cytoB kultivují za přítomnosti mitogenu, např. fytohemaglutininu (PHA).

Metabolická aktivace

16. Při použití buněk s nedostatečnou endogenní metabolickou schopností by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců ošetřených činidlem vyvolávajícím tvorbu enzymů, jako je například Aroclor 1254 (45) (46), nebo směsí fenobarbitonu a β-naftoflavonu (46) (47) (48) (49). Použití uvedené směsi není v rozporu se Stockholmskou úmlouvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (50) a s nařízením (ES) č. 850/2004 o perzistentních organických znečišťujících látkách (66), přičemž bylo prokázáno, že co se týče vyvolání tvorby oxidáz se směsí se smíšenou funkcí, je tato směs stejně účinná jako Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). V konečném zkušebním médiu se frakce S9 obvykle používá v koncentracích od 1 do 10 % (v objemovém vyjádření). Stav systému pro aktivaci metabolismu může záviset na chemické třídě zkoušené látky a v některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci S9.
17. Geneticky modifikované buněčné linie vylučující aktivační enzymy specifické pro preparáty získané od lidí a hlodavců mohou eliminovat potřebu exogenního systému pro aktivaci metabolismu a lze je používat jako zkušební buňky. V takových případech je nutno volbu použitých buněčných linií vědecky zdůvodnit, např. důležitostí oxidáz se smíšenou funkcí pro metabolismus zkoušené látky (51) a jejich schopností reagovat na známé klastogeny a aneugeny (viz samostatná část „Kritéria přijatelnosti“). Je třeba počítat s tím, že zkoušené látky nemusí být vyloučenou oxidázou (vyloučenými oxidázami) se smíšenou funkcí metabolizovány; v tom případě by negativní výsledky neprokazovaly, že zkoušená látka nemůže vyvolávat tvorbu mikrojader.

Příprava zkoušené látky

18. Pevné chemické látky by se měly před použitím k ošetření buněk rozpustit ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalně látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření buněk zředit. Plyny a těkavé látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených nádobách (52) (53). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky:

Rozpouštědla nebo vehikula

19. Rozpouštědlo nebo vehikulum nesmí reagovat se zkoušenou látkou a při použité koncentraci nesmí být neslučitelné s přežitím buněk nebo s udržením aktivity S9. Pokud se používají jiná než zavedená rozpouštědla nebo vehikula (jako jsou například voda, médium pro kultivaci buněk, dimethylsulfoxid), je nutno jejich použití podpořit údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenou látkou a o tom, že nejsou genotoxické. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula.

Používání cytoB jako blokátoru cytokineze

20. Jedním z nejdůležitějších hledisek při provádění zkoušky MNvit je zajistit, aby hodnocené buňky prodělaly mitózu během expozice zkoušené látky nebo během postexpoziční doby, pokud se používá. CytoB je látka, která se nejčastěji používá k blokování cytokineze, protože inhibuje sestavení aktinu a tím zabraňuje oddělení dceřiných buněk po mitóze, což vede ke vzniku dvoujaderných buněk (5) (54) (55). Proto lze hodnocení výskytu mikrojader omezit pouze na buňky, které prodělaly mitózu během ošetření zkoušenou látkou nebo po něm. Současně lze měřit účinek zkoušené látky na kinetiku buněčné proliferace. CytoB by se měl používat jako blokátor cytokineze při použití lidských lymfocytů, protože délky trvání buněčného cyklu budou u různých kultur a dárců proměnlivé a protože ne všechny lymfocyty budou reagovat na PHA. Při zkoušení buněčných linií za účelem určení, zda se hodnocené buňky rozdělily, se používají i jiné metody, jež jsou uvedeny níže (viz odstavec 26).
21. V laboratoři by se měla stanovit vhodná koncentrace cytoB pro každý druh buněk, aby se dosáhlo optimální četnosti dvoujaderných buněk v kontrolních kulturách s rozpouštědlem/vehikulem. Vhodná koncentrace cytoB obvykle činí 3 až 6 mg/ml.

Měření buněčné proliferace a cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

22. Při určování nejvyšší koncentrace zkušební látky je nutno se vyhnout koncentracím, které mají schopnost produkovat uměle pozitivní odezvy, například koncentracím, jež vyvolávají velmi vysokou cytotoxicitu, vysrážení v kultivačním médiu a výrazné změny pH nebo osmolality (39) (40) (41).
23. Měření buněčné proliferace se provádí proto, aby bylo zajištěno, že ošetřené buňky prodělaly během zkoušky mitózu a že se jednotlivá ošetření provádějí při vhodných úrovních cytotoxicity (viz odstavec 29). Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace u buněk, které vyžadují metabolickou aktivaci pomocí relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo relativního zdvojnásobení populace (RPD) (příslušné vzorce viz dodatek 2), pokud se ovšem nepoužívá cytoB. Při použití cytoB lze cytotoxicitu stanovit za použití replikačního indexu (RI) (příslušný vzorec viz dodatek 2).
24. Ošetření kultur cytoB a měření relativních četností jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk v kultuře představuje přesnou metodu kvantifikace účinku na buněčnou proliferaci a cytotoxického nebo cytostatického působení látky použité k ošetření kultury (5) a zajišťuje, že se hodnotí pouze buňky, které prodělaly buněčné dělení během ošetření nebo po něm.
25. Ve studiích s cytoB lze cytostázi nebo cytotoxicitu kvantifikovat podle proliferačního indexu při blokování cytokineze (CBPI) (5) (26) (56) nebo mohou být odvozeny z RI nejméně 500 buněk v každé kultuře (příslušné vzorce viz dodatek 2). Když se k posouzení buněčné proliferace používá cytoB, měl by se CBPI nebo RI určit nejméně u 500 buněk v každé kultuře. Tato měření lze mimo jiné použít k odhadu cytotoxicity porovnáním hodnot u exponované kultury s hodnotami u kontrolní kultury. Užitečné informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity (např. konfluence, počtu buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází).
26. Ve studiích bez použití cytoB je nutno prokázat, že hodnocené buňky v kultuře prodělaly buněčné dělení během ošetření zkoušenou látkou nebo po něm, jinak mohou vznikat falešně negativní odezvy. Mezi metody, které se doposud používaly k zajištění toho, aby se hodnotily pouze buňky, které prodělaly buněčné dělení, patří vpravení a následná detekce bromdeoxyuridinu (BrdU), který umožňuje identifikovat buňky, které se replikovaly (57), vytváření klonů, když se buňky z permanentních buněčných linií ošetřují a hodnotí *in situ* na mikroskopickém sklíčku (proliferační index (PI)) (25) (26) (27) (28), nebo měření relativního zdvojnásobení populace (RPD) či relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo jiné osvědčené metody (16) (56) (58) (59) (příslušné vzorce viz dodatek 2). Užitečné informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity nebo cytostáze (např. konfluence, počtu buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází).
27. Měly by se vyhodnotit nejméně tři analyzovatelné zkušební koncentrace. K tomu může být nezbytné provést experiment za použití většího množství podobných koncentrací a analyzovat tvorbu mikrojader v těch koncentracích, jež poskytují vhodný rozsah hodnot cytotoxicity. Alternativní strategie spočívá v provedení předběžné zkoušky cytotoxicity, aby se zúžil rozsah pro konečnou zkoušku.
28. Cílem je, aby nejvyšší koncentrace poskytla $55 \pm 5\%$ cytotoxicitu. Vyšší úrovně mohou jako sekundární efekt cytotoxicity vyvolat poškození chromozomů (60). Pokud dochází k výskytu cytotoxicity, měly by zvolené koncentrace pokrývat širokou škálu hodnot, které způsobují různé úrovně cytotoxicity od $55 \pm 5\%$ cytotoxicity až po nízkou nebo žádnou cytotoxicitu.

29. Pokud není zjištěna žádná cytotoxicita nebo je pozorován vznik sraženiny, měla by nejvyšší zkušební koncentrace odpovídat nejnižší z hodnot 0,01 M, 5 mg/ml nebo 5 µl/ml. Vzájemný rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi zvolenými pro analýzu by obecně neměly činit více než 10 %. U zkoušených látek, které vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, může být nezbytné, zvolit menší kroky mezi jednotlivými koncentracemi zkoušené látky, aby mohly být ohodnoceny i kultury se středními a nízkými rozsahy toxicity.
30. Když je limitujícím faktorem rozpustnost, měla by se maximální koncentrace, pokud není omezena cytotoxicitou, rovnat nejnižší koncentraci, při které je v kulturách viditelná minimální sraženina, pokud to ovšem neovlivní vyhodnocení. Hodnocení precipitace by se mělo provádět takovými metodami, jako je světelná mikroskopie, přičemž je nutno si všimnout sraženiny, která přetrvává nebo se objeví během kultivace (před ukončením expozice).

Kontroly

31. Součástí každého experimentu by měly být souběžné pozitivní kontroly a kontroly s rozpouštědlem/vehikulem při současné metabolické aktivaci a bez ní.
32. Pozitivní kontroly jsou nezbytné k prokázání schopnosti použitých buněk a zkušebního protokolu identifikovat klastogeny a aneugeny a potvrdit metabolickou schopnost přípravku S9. Pozitivní kontrola by měla využívat známé látky podněcující tvorbu mikrojader v koncentracích, u nichž se předpokládá malé, avšak reprodukovatelné zvýšení nad hodnoty pozadí, a měla by prokázat citlivost zkušebního systému. Koncentrace pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo totožnost kódovaného preparátu.
33. Klastogenní látka, která vyžaduje metabolickou aktivaci (např. cyklofosfamid, benzo[a]pyren) by se měla použít k prokázání jak schopnosti metabolismu buněk, tak schopnosti zkušebního systému zjistit přítomnost klastogenů. V odůvodněných případech lze používat i další pozitivní kontroly. Jelikož některé pozitivní kontroly, které vyžadují metabolickou aktivaci, mohou za určitých podmínek ošetření nebo u určitých buněčných linií působit i bez exogenní metabolické aktivace, je nutno u zvolené buněčné linie při zvolených koncentracích otestovat potřebnost metabolické aktivace a rovněž účinnost přípravku S9.
34. V současné době nejsou známy žádné aneugenní látky, které by ke svému genotoxickému působení vyžadovaly metabolickou aktivaci (16). Mezi v současnosti uznávané pozitivní kontroly aneugenního působení patří například kolchicin a vinblastin. Jiné chemické látky lze použít v případě, že vyvolávají vznik mikrojader výhradně nebo převážně prostřednictvím aneugenního působení. Aby nebyly nutné dvě pozitivní kontroly (na klastogenicitu a aneugenicitu) bez metabolické aktivace, může kontrola aneugenicity sloužit jako pozitivní kontrola bez použití přípravku S9 a kontrolu klastogenicity lze využít k testování vhodnosti použitého systému metabolické aktivace. Pozitivní kontrola na klastogenicitu a aneugenicitu by se měly používat u buněk, které nevyžadují použití přípravku S9. Navrhované pozitivní kontroly jsou uvedeny v dodatku 3.
35. Lze zvážit použití pozitivní kontroly související s určitou chemickou třídou, pokud jsou k dispozici vhodné chemické látky. Všechny použité pozitivní kontroly by měly být vhodné pro daný druh buněk a podmínky aktivace.
36. Studie by měla zahrnovat kontroly s rozpouštědlem/vehikulem při každém odběru buněk k vyhodnocení. Kromě toho by se měly používat rovněž neošetřené negativní kontroly (bez rozpouštědla/vehikula), pokud nejsou publikovány nebo pokud nemá laboratoř dřívější kontrolní údaje, jež prokazují, že zvolené rozpouštědlo při použitých koncentracích nevyvolává žádné genotoxické ani jiné škodlivé účinky.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Harmonogram aplikace

37. Aby se maximalizovala pravděpodobnost detekce aneugenní nebo klastogenní látky působící v určitém stadiu buněčného cyklu, je důležité, aby byl dostatečný počet buněk ošetřen zkoušenou látkou ve všech fázích jejich buněčných cyklů. Harmonogram aplikace pro buněčné linie a primární buněčné kultury se proto může poněkud lišit od harmonogramu aplikace u lymfocytů, které k zahájení svého buněčného cyklu potřebují mitogenní stimulaci, přičemž o jednotlivých harmonogramech pojednávají odstavce 41 až 43 (16).
38. Teoretické úvahy spolu s publikovanými údaji (18) ukazují, že většina aneugenních a klastogenních látek bude detekována za použití krátkodobé expozice v trvání 3 až 6 hodin za přítomnosti i nepřítomnosti přípravku S9, po níž následuje odstranění zkoušené látky a doba růstu v délce 1,5 až 2,0 buněčných cyklů (6). Vzorky buněk se odebírají v době odpovídající asi 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžného buněčného cyklu (tzn. bez aplikace zkoušené látky), buď po začátku nebo na konci aplikace (viz tabulka 1). Interval odběru vzorků nebo obnovy kultur lze prodloužit, pokud je známo nebo existuje podezření, že zkoušená látka ovlivňuje trvání buněčného cyklu (například při zkoušení analogů nukleosidů).

39. Vzhledem k možnému cytotoxickému působení přípravků S9 na kultivované savčí buňky se prodloužená expozice v trvání 1,5násobku až 2,0násobku běžných buněčných cyklů používá jen za nepřítomnosti S9. Při prodloužené expozici existují možnosti, které dovolují ošetřit buňky zkoušenou látkou za nepřítomnosti nebo za přítomnosti cytoB. Tyto možnosti jsou určeny pro situace, kdy mohou být obavy ohledně možných interakcí mezi zkoušenou látkou a cytoB.
40. Navrhované harmonogramy expozice buněk jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto obecné harmonogramy expozice lze upravit v závislosti na stabilitě a reaktivitě zkoušené látky nebo zvláštních růstových charakteristikách použitých buněk. Veškeré expozice by měly být zahájeny a ukončeny v okamžiku, kdy počet buněk exponenciálně narůstá. Tyto harmonogramy jsou podrobněji uvedeny v následujících odstavcích 41 až 47.

Tabulka 1

Doby expozic a odběru buněk k vyhodnocení v rámci zkoušky MNvit

Lymfocyty, primární buňky a buněčné linie ošetřené s cytoB	+ S9	Expozice po dobu 3–6 hod. za přítomnosti S9; odstranění S9 a expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
	– S9 Krátká expozice	Expozice po dobu 3–6 hod.; odstranění expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
	– S9 Prodloužená expozice	Možnost A: Expozice po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů za přítomnosti cytoB; odběr k vyhodnocení na konci doby expozice. Možnost B: Expozice po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů; odstranění zkušební látky; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.

Buněčné linie ošetřené bez cytoB
(Harmonogramy jsou shodné s harmonogramy uvedenými výše s výjimkou toho, že se nepřidává žádný cytoB.)

Lymfocyty, primární buňky a buněčné linie s cytoB

41. U lymfocytů je nejúčinnější zahájit expozici zkoušené látky za 44–48 hodin po stimulaci PHA, až zmizí synchronizace cyklů (5). Při úvodní zkoušce se nechá na buňky působit zkoušená látka po dobu 3 až 6 hodin za nepřítomnosti a za přítomnosti S9. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem obsahujícím cytoB a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
42. Pokud jsou obě úvodní zkoušky s krátkou expozicí (3–6 hod.) negativní nebo nejednoznačné, použije se následná prodloužená expozice bez přítomnosti S9. K dispozici jsou dvě možnosti provedení zkoušky, přičemž obě jsou stejně přijatelné. Může však být vhodnější postupovat podle možnosti A pro stimulované lymfocyty, kde může exponenciální nárůst počtu buněk začít 96 hodin po stimulaci klesat. Při použití možnosti B by také buněčné kultury neměly před konečným odběrem vzorku dosáhnout konfluence.
- Možnost A: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů a odeberou se k vyhodnocení na konci doby expozice.
 - Možnost B: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
43. Primární buňky a buněčné linie je nutno ošetřit stejným způsobem jako lymfocyty kromě toho, že není nutno je stimulovat pomocí PHA po dobu 44–48 hodin. Jiné buňky než lymfocyty by měly být vystaveny působení zkoušené látky tak, aby v okamžiku ukončení studie byly buňky stále ve fázi růstu, při které se jejich počet exponenciálně zvyšuje.

Buněčné linie bez cytoB

44. Buňky je nutno vystavit působení zkoušené látky po dobu 3–6 hodin za přítomnosti a nepřítomnosti S9. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
45. Pokud jsou obě úvodní zkoušky s krátkou expozicí (3–6 hod.) negativní nebo nejednoznačné, použije se následná prodloužená expozice (bez přítomnosti S9). K dispozici jsou dvě možnosti provedení zkoušky, přičemž obě jsou stejně přijatelné.
- Možnost A: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů a odeberou se k vyhodnocení na konci doby expozice.
 - Možnost B: Buňky jsou vystaveny působení zkoušené látky po dobu odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů. Zkušební médium se odstraní a nahradí čerstvým médiem a buňky se odeberou k vyhodnocení po uplynutí doby odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
46. Na konci doby expozice v trvání 3–6 hodin se v monovrstvách mohou vyskytovat mitotické buňky (které se vyznačují okrouhlým tvarem a odchlípnutím od povrchu). Jelikož lze tyto mitotické buňky snadno oddělit, mohou být při odstranění média obsahujícího zkoušenou látku ztraceny. Tyto buňky je třeba při promývání kultur shromáždit a vrátit je zpět, aby při odběru k vyhodnocení nedošlo ke ztrátě buněk, které se nacházejí ve fázi mitózy a jsou ohroženy vznikem mikrojadér.

Počet kultur

47. Pro každou koncentraci zkoušené látky a v případě kultur s vehikulem/rozpuštědlem a kultur negativních kontrol je nutno použít duplicitní kultury. Pokud lze na základě předešlých laboratorních údajů prokázat minimální rozdíl mezi duplicitními kulturami, může být přijatelné použít jen po jedné kultuře. V případě použití vždy jen jedné kultury se doporučuje analyzovat zvýšený počet koncentrací.

Odběr buněk a příprava preparátů

48. Buňky z každé kultury se odebírají a zpracovávají zvlášť. Příprava buněk může zahrnovat hypotonizaci, ale tento krok není nutný, pokud se dosáhne odpovídajícího rozšíření buněk jiným způsobem. Při přípravě preparátů lze použít různé postupy za předpokladu, že zajistí získání vysoce kvalitních buněčných preparátů pro vyhodnocení. Cytoplazmu buněk je nutno uchovat, aby bylo možné provést detekci mikrojadér a (v případě metody s blokováním cytokineze) spolehlivou identifikaci dvoujaderných buněk.
49. Preparáty lze barvit pomocí různých metod, jako je Giemsa nebo použití fluorescenční barviva se specifickou vazbou na DNA (59). Použitím barviva se specifickou vazbou na DNA (jako je např. akridinová oranž (61) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (62)) se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva bez specifické vazby na DNA. Jsou-li předmětem zájmu informace o mechanismu vzniku mikrojadér, lze k identifikaci jejich obsahu (chromozom nebo chromozomální fragment) využít protilátky proti kinetochorům, hybridizační metodu FISH využívající pan-centromerické DNA-sondy, případně značení *in situ* pomocí primerů se specifickou pan-centromerickou vazbou spolu s vhodným kontrastním barvením DNA (15) (16). K rozlišení mezi klastogeny a aneugeny lze použít i jiné metody, pokud se ukázaly jako účinné.

Analýza

50. Všechny preparáty včetně preparátů s rozpouštědlem/vehikulem a preparátů kontrol by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle označeny kódem. Nebo lze kódované vzorky analyzovat za použití validovaného automatického systému pro průtokovou cytometrii nebo systému pro analýzu obrazu.
51. V případě kultur ošetřených pomocí cytoB by se měla analyzovat četnost výskytu mikrojadér nejméně u 2 000 dvoujaderných buněk pro každou koncentraci (nejméně u 1 000 dvoujaderných buněk z každé kultury; po dvou kulturách pro každou koncentraci). V případě použití vždy jen jedné kultury by se mělo z každé kultury vyhodnotit alespoň 2 000 dvoujaderných buněk pro každou koncentraci. Pokud je k dispozici k vyhodnocení pro každou koncentraci podstatně méně než 1 000 dvoujaderných buněk z každé kultury (respektive než 2 000, jestliže se použije jen jedna kultura) a není-li zjištěn výrazný nárůst výskytu mikrojadér, musí se zkouška zopakovat za použití většího počtu buněk nebo při méně toxických koncentracích (podle toho, co z těchto dvou možností připadá v úvahu). Je třeba dbát na to, aby se nezapočítávaly dvoujaderné buňky, které mají nepravidelný tvar nebo jejichž dvě jádra se svou velikostí navzájem značně liší; také se nesmějí za dvoujaderné buňky mýlně považovat nedostatečně rozšířené jednojaderné buňky. Buňky obsahující více než dvě hlavní jádra by se neměla analyzovat na přítomnost mikrojadér, jelikož základní četnost mikrojadér může být v těchto buňkách vyšší (63) (64). Započtení jednojaderných buněk je přijatelné, pokud se prokáže, že zkoušená látka narušuje působení cytoB.

52. U buněčných linií zkoušených bez ošetření cytochalasinem B by se měla vyhodnotit četnost mikrojadér alespoň u 2 000 buněk pro každou koncentraci (alespoň u 1 000 buněk z každé kultury; po dvou kulturách pro každou koncentraci). Při použití pouze jedné kultury pro každou koncentraci by se mělo vyhodnotit nejméně 2 000 buněk z dané kultury.
53. Při použití cytoB by se měla určit hodnota CBPI nebo RI k posouzení buněčné proliferace (viz dodatek 2) za použití nejméně 500 buněk z každé kultury. Když se expozice provádí bez přítomnosti cytoB, je nezbytné prokázat, že hodnocené buňky prodělaly proliferaci, jak je vysvětleno v odstavcích 24 až 27.

Kritéria přijatelnosti

54. Laboratoř, která navrhuje používání zkoušky MNvit popsané v této ZM, by měla prokázat svou schopnost spolehlivě a přesně detekovat chemické látky se známým aneugenním a klastogenním působením, při použití metabolické aktivace i bez ní, jakož i známé negativní látky za použití srovnávacích látek uvedených v dodatku 3. Svou schopnost správně provádět tuto ZM by měla laboratoř prokázat předložením důkazů, že buňky, u nichž vyhodnocuje tvorbu mikrojadér, prodělaly jedno jaderné dělení, pokud se zkouška provádí bez použití cytoB.
55. Jako srovnávací látky se doporučuje používat chemické látky uvedené v dodatku 3. Náhradní nebo další chemické látky lze rovněž používat, pokud jsou známy jejich účinky, pokud vyvolávají tvorbu mikrojadér stejným mechanismem působení a pokud je prokázáno, že mají vztah k chemickým látkám, které se budou testovat za použití postupu MNvit. Součástí zdůvodnění může být validační studie využívající širokou škálu látek nebo zaměřená na užší spektrum na základě chemické třídy zkoušené látky nebo zkoumaného mechanismu vzniku poškození.
56. Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem a neošetřené kultury by měly poskytovat reprodukovatelně nízké a konzistentní četnosti mikrojadér (obvykle 5–25 mikrojadér na 1 000 buněk v případě druhů buněk uvedených v odstavci 11). Jiné druhy buněk mohou mít odlišné rozsahy odezvy, které by měly být stanoveny při validaci jejich používání v rámci zkoušky MNvit. Údaje z negativních kontrol, kontrol s rozpouštědlem a pozitivních kontrol by měly sloužit ke stanovení dosavadních kontrolních rozmezí. Tyto hodnoty by se měly použít při rozhodování o vhodnosti zařazení souběžných negativních nebo pozitivních kontrol do experimentu.
57. Jsou-li pro provedení zkoušky navrhovány menší změny protokolu (např. použití automatizovaných namísto ručních postupů vyhodnocování, použití nového druhu buněk), je nutno prokázat účelnost této změny, nežli lze upravený protokol považovat za přijatelný k použití. Součástí prokázání účelnosti je důkaz, že lze zjistit hlavní mechanismy poškození chromozomů a zvýšení nebo snížení jejich počtu a že lze dosáhnout odpovídajících pozitivních i negativních výsledků u třídy jednotlivé látky nebo širokého spektra látek, které se mají testovat.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Zpracování výsledků

58. Pokud se používá technika blokování cytokineze, slouží k hodnocení indukce vzniku mikrojadér jen četnost dvoujaderných buněk s mikrojádry (nezávisle na počtu mikrojadér v každé buňce). Počítání buněk s jedním, dvěma nebo více mikrojádry by mohlo poskytnout užitečné informace, ale není povinné.
59. Souběžně by se mělo provádět měření cytotoxicity a/nebo cytostáze u všech ošetřených kultur a u kontrolních kultur s rozpouštědlem/vehikulem (58). Při použití metody s blokováním cytokineze, by se měly vypočítat hodnoty CBPI nebo RI u všech ošetřených a kontrolních kultur jako ukazatele zpoždění buněčného cyklu. V případě nepřítomnosti cytoB by se měly použít hodnoty RPD, RICC nebo PI (viz dodatek 2).
60. Je nutno uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.
61. Chemické látky, které vyvolávají vznik mikrojadér při zkoušce MNvit, mají tento účinek proto, že vyvolávají poškození chromozomů, ztrátu chromozomů nebo kombinaci obou těchto dějů. Při určování, zda je mechanismus vyvolání tvorby mikrojadér důsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení, lze uplatnit další analýzu za použití protilátek proti kinetochorům, sond *in situ* se specifickou vazbou na centromery nebo jiných metod.

Hodnocení a interpretace výsledků

62. Žádné ověření jednoznačně pozitivní nebo negativní odezvy pomocí dodatečné zkoušky není nutné. Nejednoznačné výsledky lze objasnit analýzou dalšího 1 000 buněk ze všech kultur, aby se zabránilo ztrátě zaslepení. Pokud tento přístup výsledek neobjasní, mělo by se provést další testování. Při následných experimentech by se mělo zvážit upravení parametrů studie v rozšířeného nebo zúženého rozsahu podmínek podle toho, co přichází v úvahu. Mezi parametry studie, které lze případně upravit, patří velikost kroku mezi jednotlivými zkušebními koncentracemi, načasování expozice a odběru buněk k vyhodnocení a/nebo podmínky metabolické aktivace.

63. Existuje několik kritérií pro stanovení pozitivního výsledku, například s koncentrací související nebo statisticky významné zvýšení počtu buněk obsahujících mikrojádra. Nejprve je nutno posoudit biologický význam výsledků. Při hodnocení významu biologické odpovědi může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu dosavadních hodnot kontrol. Při hodnocení výsledků zkoušky lze jako pomůcku použít vhodné statistické metody (65). Výsledky statistických testů je však třeba posuzovat s ohledem na závislost odezvy na dávku. V úvahu je nutno vzít také reprodukovatelnost a dosavadní údaje.
64. Ačkoli většina experimentů poskytne jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v některých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o působení zkoušené látky. Tyto dvojnásobné nebo sporné odezvy se mohou vyskytovat bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.
65. Pozitivní výsledky zkoušky MNvit znamenají, že zkoušená látka vyvolává v kultivovaných savcích buňkách poškození nebo ztrátu chromozomů. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za použitých podmínek zkoušky nevyvolává poškození chromozomů a/nebo nárůst či pokles počtu kultivovaných savcích buněk.

Protokol o zkoušce

66. Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace, pokud jsou pro provedení studie významné:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje a registrační číslo CAS a číslo ES,
- skupenství a čistota,
- fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provedení studie,
- reaktivita zkoušené látky s rozpouštědlem/vehikulem nebo médiem pro kultivaci buněk.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění výběru rozpouštědla/vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu.

Buňky:

- druh a zdroj použitých buněk,
- vhodnost použitého druhu buněk,
- nepřítomnost mykoplasmat, pokud připadá v úvahu,
- informace o trvání buněčného cyklu, době zdvojnásobení populace nebo proliferačním indexu,
- při použití lymfocytů je případně nutno uvést pohlaví, věk a počet dárců krve,
- při použití lymfocytů je nutno uvést, zda se exponuje plná krev nebo odstředěné lymfocyty,
- počet průchodů, pokud připadá v úvahu,
- metody udržování buněčných kultur, pokud připadá v úvahu,
- modální hodnota počtu chromozomů,
- běžné trvání buněčného cyklu (u negativní kontroly).

Zkušební podmínky:

- totožnost látky blokující cytokinezi (např. cytoB), pokud je použita, a její koncentrace a trvání expozice buněk,
- zdůvodnění volby koncentrací a počtu kultur včetně údajů o cytotoxicitě a omezeních rozpustnosti, jsou-li tyto informace k dispozici,

- složení média, případně koncentrace CO₂,
- hodnoty koncentrace zkoušené látky,
- koncentrace (a/nebo objem) přidaného vehikula a zkoušené látky,
- teplota a doba inkubace,
- trvání expozice,
- doba od expozice do odběru buněk k vyhodnocení,
- hustota buněk při naočkování média, pokud připadá v úvahu,
- druh a složení metabolického aktivačního systému včetně kritérií přijatelnosti,
- látky použité jako pozitivní a negativní kontrola,
- metody přípravy preparátů a použitý postup barvení,
- kritéria pro identifikaci mikrojadra,
- počty analyzovaných buněk,
- metody měření cytotoxicity,
- jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity,
- kritéria pro označení studií za pozitivní, negativní nebo dvojznačné,
- použité metody statistické analýzy,
- tam, kde je to vhodné, je nutno uvést rovněž metody (například využití protilátek proti kinetochorům), které slouží k určení, zda mikrojádra obsahují celé nebo rozlámané chromozomy.

Výsledky:

- použitý způsob měření cytotoxicity, např. CBPI nebo RI nebo v případě metody blokování cytokineze, respektive RICC nebo RPD nebo PI, pokud se metody blokování cytokineze nepoužívají, popřípadě jiné poznatky, např. konfluence buněk, apoptóza, nekróza, počítání metafází, četnost dvoujaderných buněk,
- známky precipitace,
- hodnoty pH a osmolality zkušebního média, pokud jsou zjištěny,
- vymezení přijatelných buněk pro analýzu,
- rozložení jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk, pokud se používá metoda blokování cytokineze,
- počet buněk s mikrojádry uvedený zvlášť u každé ošetřené a kontrolní kultury a případně určení, zda se jedná o dvoujaderné nebo jednojaderné buňky,
- pokud možno závislost odezvy na koncentraci,
- chemické údaje (koncentrace a rozpouštědla) souběžných negativních kontrol (s rozpouštědlem/vehikulem) a pozitivních kontrol,
- chemické údaje (koncentrace a rozpouštědla) dřívějších negativních kontrol (s rozpouštědlem/vehikulem) a pozitivních kontrol s uvedením rozsahů, střední hodnoty, směrodatné odchylky a intervalu spolehlivosti (např. 95 %),
- statistická analýza, případně p hodnoty.

Rozbor výsledků

Závěry

LITERATURA

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1–4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3–15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233–246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167–172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193–198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34–43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9–20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297–302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329–334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205–213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519–525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9–20.
- (14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233–245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211–219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153–163.
- (17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [www.oecd.org/env/testguidelines].

- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13–36.
- (19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37–60.
- (20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelster, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61–87.
- (21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88–124.
- (22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125–152.
- (23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187–208.
- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45–59.
- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81–116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183–190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55–71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137–163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123–134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569–580.
- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1–152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16–17 November, 2006, K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, K dispozici na adrese: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271–283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105–115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257–260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.
- (38) Gibson, D.P., Brauning, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61–70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147–205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297–305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789–886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29–36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11–18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173–215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.
- (47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175–177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.
- (49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.
- (50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). K dispozici na adrese: [<http://www.pops.int/>].

- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247–274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91–103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795–801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35–44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103–112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to 'Report from the *in vitro* micronucleus assay working group', *Mutation Res.*, 564, 97–100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61–65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1–3.
- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169–184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191–201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269–275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65–75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463–467.
- (66) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 850/2004 ze dne 29. dubna 2004 o perzistentních organických znečišťujících látkách a o změně směrnice 79/117/EHS (Úř. věst. L 229, 30.4.2004, s. 5).

Dodatek 1

Definice

Aneugen: jakákoli látka nebo proces, který v interakci se složkami mitotického a meiotického cyklu buněčného dělení vede k aneuploidii v buňkách nebo organismech.

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Apoptóza: programovaná buněčná smrt, která se vyznačuje řadou kroků vedoucích k rozpadu buněk na membránově vázané části, které jsou poté odstraněny fagocytózou nebo rozkladem.

Buněčná proliferace: zvyšování počtu buněk v důsledku jejich mitotického dělení.

Centromera: oblast DNA v chromozomu, kde se stýkají obě chromatidy a k níž jsou bok po boku připojeny oba kinetochory.

Klastogen: jakákoli látka nebo proces, který způsobuje strukturální chromozomální aberace v populacích buněk nebo organismů.

Cytokineze: proces rozdělení buňky ihned po mitóze, čímž vzniknou dvě dceřiné buňky, z nichž každá obsahuje jedno jádro.

Proliferační index při blokování cytokineze (CBPI): podíl počtu buněk z druhého dělení v ošetřené populaci k jejich počtu v neošetřené kontrole (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytostáze: inhibice růstu buněk (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytotoxicita: škodlivé účinky na strukturu nebo funkci buňky, které nakonec způsobí její smrt.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, přestavby aduktů, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Interfázové buňky: buňky, které se nenacházejí ve stádiu mitózy.

Kinetochor: struktura obsahující proteiny, jež se vytváří u centromery chromozomu, na kterou se při dělení buněk napojují vlákna dělicího vřeténka, což umožňuje správný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitózy (meiózy) nereplikujícími se (lagging) chromozomovými fragmenty nebo celými chromozomy.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometáfázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mitotický index: poměr buněk v metafázi vydělený celkovým počtem buněk zjištěných v populaci buněk; udává stupeň buněčné proliferace této populace.

Mutagení: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomální aberace).

Nondisjunkce: děj, při kterém se párové chromatidy nerozloučí a správně nerozdělí do vznikajících dceřiných buněk, což vede ke vzniku dceřiných buněk s abnormálními počty chromozomů.

Polyploidie: numerické chromozomální aberace v buňkách nebo organismech, které se týkají celé sady (celých sad) chromozomů, na rozdíl od jednoho chromozomu nebo jednotlivých chromozomů (aneuploidie).

Proliferační index (PI): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní nárůst počtu buněk (RICC): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní zdvojnásobení populace (RPD): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Replikační index (RI): podíl počtu dokončených cyklů buněčného dělení v ošetřené kultuře k jejich počtu v neošetřené kontrole během expoziční doby a obnovy kultury (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Zkoušená látka: jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Dodatek 2

Vzorce pro hodnocení cytotoxicity

1. Při použití cytoB by mělo být hodnocení cytotoxicity založeno na proliferačním indexu při blokování cytokineze (CBPI) nebo na replikačním indexu (RI) (16) (58). Hodnota CBPI udává průměrný počet buněčných cyklů na buňku v době jejího vystavení cytochalasinu B a lze ji použít k výpočtu proliferace buněk. Hodnota RI udává relativní počet jader v ošetřených kulturách ve srovnání s kontrolními kulturami a lze ji použít k výpočtu procenta cytostáze:

$$\% \text{ cytostáze} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

přičemž:

T = kultura ošetřená zkoušenou látkou

C = kontrolní kultura s vehikulem

kde:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{počet jednojaderných buněk}) + (2 \times \text{počet dvoujaderných buněk}) + (3 \times \text{počet vícejaderných buněk}))}{(\text{celkový počet buněk})}$$

Hodnota CBPI = 1 (všechny buňky jsou jednojaderné) tedy odpovídá 100 % cytostázi.

$$\text{Cytostáze} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{počet dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{počet vícejaderných buněk})) \div (\text{celkový počet buněk})_T}{((\text{počet dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{počet vícejaderných buněk})) \div (\text{celkový počet buněk})_C} \times 100$$

T = ošetřené kultury

C = kontrolní kultury

2. Hodnota RI = 53 % tedy znamená, že v porovnání s počtem buněk, z nichž v kontrolní kultuře vznikly rozdělením dvoujaderné a vícejaderné buňky, se v ošetřené kultuře rozdělilo pouze 53 % tohoto počtu, což znamená 47 % cytostázi.

3. Když se cytoB nepoužije, doporučuje se hodnotit cytotoxicitu na základě relativního nárůstu počtu buněk (RICC) nebo relativního zdvojnásobení populace (RPD) (58), jelikož oba tyto ukazatele zohledňují poměr buněčné populace, která se rozdělila.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{zvýšení počtu buněk v ošetřených kulturách (konečný stav - počáteční stav)})}{(\text{zvýšení počtu buněk v kontrolních kulturách (konečný stav - počáteční stav)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{počet zdvojnásobení populace v ošetřených kulturách})}{(\text{počet zdvojnásobení populace v kontrolních kulturách})} \times 100$$

kde:

$$\text{Zdvojnásobení populace} = [\log (\text{počet buněk po ošetření} \div \text{počáteční počet buněk})] \div \log 2$$

4. Hodnota RICC nebo RPD ve výši 53 % tedy znamená 47 % cytotoxicitu/cytostázi.

5. Za použití indexu proliferace (PI) lze posoudit cytotoxicitu spočítáním klonů tvořených 1 buňkou (cl1), 2 buňkami (cl2), 3 až 4 buňkami (cl4) a 5 až 8 buňkami (cl8)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. Hodnota PI se používá jako cenný a spolehlivý parametr cytotoxicity i pro buněčné linie kultivované *in situ* bez přítomnosti cytoB (25) (26) (27) (28).

Dodatek 3

Srovnávací látky doporučené pro hodnocení funkčnosti⁽¹⁾

Kategorie	Chemická látka	Číslo CAS	Číslo ES
1. Klastogeny působící bez metabolické aktivace			
	cytarabin	147-94-4	205-705-9
	mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeny vyžadující metabolickou aktivaci			
	benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeny			
	kolchicin	64-86-8	200-598-5
	vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negativní látky			
	bis(2-ethylhexyl)ftalát	117-81-7	204-211-0
	kyselina nalidixová	389-08-2	206-864-7
	pyren	129-00-0	204-927-3
	chlorid sodný	7647-14-5	231-598-3

(¹) Srovnávací látky jsou chemické látky doporučené k použití. Chemické látky uvedené v seznamu srovnávacích látek je možno nahradit jinými látkami nebo lze do seznamu doplnit další látky, pokud jsou známy jejich účinky a pokud vyvolávají tvorbu mikrojader stejným mechanismem působení a pokud je prokázáno, že mají vztah k chemickým látkám, které se budou testovat za použití postupu MNvit. V závislosti na účelu může být součástí zdůvodnění také validační studie využívající širokou škálu látek nebo zaměřená na užší spektrum na základě chemické třídy zkoušené látky nebo zkoumaného mechanismu vzniku poškození.

B.50. SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: DA

ÚVOD

- Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2)(3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Metoda LLNA: DA (kterou vyvinula firma Daicel Chemical Industries, Ltd.) je neradioaktivní modifikací metody LLNA, která kvantifikuje obsah adenosin trifosfátu (ATP) prostřednictvím bioluminiscence, jež slouží jako indikátor proliferace lymfocytů. Zkušební metoda LLNA: DA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12) (13). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (14). Zkušební metoda LLNA (podle kapitoly B.42 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 429 a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA DA (podle kapitoly B.50 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 A) a metoda LLNA: BrdU-ELISA (podle kapitoly B.51 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 B) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.
- Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: DA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivitě při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14).

DEFINICE

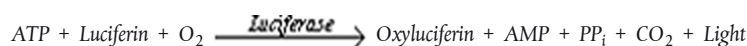
- Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkušební metoda LLNA: DA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: DA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 (14); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: DA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: DA (viz odstavec 5)), a také aby se usnadnila volba dávkování.
5. Zkušební metoda LLNA: DA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14). Kromě toho metoda LLNA: DA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: DA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: DA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (14), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406 (14) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkresení výsledků (16). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: DA (10). Použití metody LLNA: DA navíc nemusí být vhodné pro zkoušení látek, které ovlivňují hladiny ATP (např. látek, jež působí jako inhibitory ATP), nebo látek, které ovlivňují přesnost měření intracelulárního ATP (např. přítomnost enzymů snižujících hladinu ATP nebo přítomnost extracelulárního ATP v lymfatických uzlinách). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: DA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: DA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,8 do 2,5 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 44 látek za použití hodnot SI $\geq 1,8$ (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: DA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala tři z 12 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,8 do 2,5 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

6. Základní podstata metody LLNA: DA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být $\geq 1,8$, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu ATP za použití bioluminescence (o níž je známo, že její intenzita je úměrná počtu živých buněk) (17) k indikaci zvýšeného počtu proliferujících buněk lymfatických uzlin drenujících aurikulární oblast (18) (19). Bioluminescenční metoda využívá enzym luciferázu ke katalyzaci tvorby světla z ATP a luciferinu v rámci této reakce:



Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná koncentraci ATP a měří se pomocí luminometru. Zkouška založená na použití luciferinu a luciferázy je citlivou metodou pro určení množství ATP, která se používá k široké škále účelů (20).

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: DA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/J, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (12) (13). Používají se mladé dospělé samice myši, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: DA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (21), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzivní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvě, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: DA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: DA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) $> 1,8$ ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 10 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.
12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: DA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: DA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během průměrné doby (tzn. během méně než jednoho roku).
13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: DA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na průměrenost dosavadní databáze.
14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na průměrenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (22).

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (23). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.
16. V případech, kdy se hodnotí látka, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:
- strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,
 - známé fyzikálně-chemické vlastnosti,
 - podklady ze zkoušky LLNA: DA,
 - podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.
18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (24). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (24) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).
19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), N,N-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejné přípravky obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nestěče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.
20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílů mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (22). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: DA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: DA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: DA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 8) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibližně 48 hodin po první dávce) a v den 7 (24 hodin před ukončením) a v den 8. Kromě toho lze v den 8 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humaně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: DA zvolí nejbližší nižší dávka v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18), která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30) (31) (32) (33) (34).
24. O systémové toxicitě (35) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: DA: změny fungování nervového systému (např. piloerectce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činnosti týkající se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 8 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humaně usmrtit (36).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

- Den 1: Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se čtyřmi až pěti tahy štětečku namočeného do 1 % vodného roztoku natrium-dodecylsulfátu (SLS) nanese tento roztok tak, aby pokryl celou plochu hřbetu ucha. Jednu hodinu po nanesení roztoku SLS se na hřbet každého ucha aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávne jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).
- Den 2, den 3 a den 7: Zopakuje se postup předběžného ošetření 1 % vodným roztokem SLS a nanesení zkoušené látky provedený v den 1.
- Den 4, den 5 a den 6: Žádná aplikace.
- Den 8: Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 až 30 hodin po zahájení aplikace v den 7 se zvířata humaně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufovému fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (22). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví tak, že se lymfatické uzliny vloží mezi dvě podložná sklíčka a lehkým tlakem se rozdrtí. Po potvrzení, že je tkáň rozprostřena v tenké vrstvě, se sklíčka odtáhnou od sebe. Tkáň z obou sklíček se suspendují v roztoku PBS tak, že se každé sklíčko podrží nakloněné nad Petriho miskou a oplachuje se roztokem PBS při současném seškrabování tkáně ze sklíčka stěrkou na buňky. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. K opláchnutí obou sklíček by se měl použít celkový objem 1 ml PBS. Suspenzi buněk lymfatických uzlin je nutno v Petriho misce zlehka homogenizovat stěrkou na buňky. Mikropipetou se pak nabere 20 μ L poměrný díl suspenze buněk z lymfatických uzlin – přičemž je třeba nenabrat membránu, která je viditelná pouhým okem – a následně se smísí s 1,98 ml PBS, abychom dostali 2 ml vzorku. Druhý vzorek o objemu 2 ml se pak připraví stejným způsobem, aby vznikly od každého zvířete dva vzorky.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu ATP v lymfocytech)

27. Zvýšení obsahu ATP v lymfatických uzlinách se zjišťuje metodou, která je založena na použití luciferinu a luciferázy, za pomoci soupravy pro měření obsahu ATP, která měří bioluminescenci v relativních jednotkách luminescence (RLU). U všech jednotlivých zvířat je nutno dodržet stejnou dobu od usmrcení do změření obsahu ATP, která by měla činit přibližně 30 minut, protože se má za to, že obsah ATP postupně klesá v závislosti na době uplynulé od usmrcení zvířete (12). Proto je nutno celou řadu úkonů od vynětí aurikulárních lymfatických uzlin až do změření obsahu ATP dokončit do 20 minut podle předem stanoveného harmonogramu, který je u každého zvířete stejný. Luminescenci ATP je nutno změřit u každého 2 ml vzorku, takže se získají dvě hodnoty ATP za každé zvíře. Pak se určí průměrná luminescence ATP, která se použije v následných výpočtech (viz odstavec 30).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (36).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty RLU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty RLU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota $SI \geq 1,8$ (10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,8 do 2,5) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (2) (3) (37).

32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,8 do 2,5 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myši způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovní jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehle hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami RLU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou RLU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),
- jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),
- zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

- zdroj myší z kmene CBA,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet a věk zvířat,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy pro měření obsahu ATP, které se týkají prokazování a kontroly kvality,
- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),
- použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,
- podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),
- podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,
- metody měření toxicity,
- kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,
- údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

- údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,
- pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

- hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,
- u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,
- doba usmrcení a doba změření množství ATP u každého zvířete,
- tabulka hodnot RLU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu,
- průměrná hodnota RLU na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehých hodnot za každou exponovanou skupinu,
- vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,
- závislost odezvy na dávce,
- případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985–997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49–59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274–286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-da/TMER.htm>].
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.
- (14) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81–88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127–132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346–370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (36) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- (38) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (38).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (38).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (38).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (38).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímává osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenů, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

B.51. SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: BRDU-ELISA

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myši, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1 a kapitola B.42 této přílohy). Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] je neradioaktivní modifikace zkušební metody LLNA, která k měření proliferace lymfocytů využívá neradioaktivně značený 5-brom-2-deoxyuridin (BrdU) (Reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) v rámci systému založeném na zkoušce ELISA. Metoda LLNA: BrdU-ELISA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní vědeckou komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA (kapitola B.42 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 429) a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 B) a metoda LLNA: DA (kapitola B.50 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 A) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (13), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.

- Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: BrdU-ELISA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivity při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13).

DEFINICE

- Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

- Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: BrdU-ELISA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: BrdU-ELISA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: BrdU-ELISA [viz odstavec 5]), a také aby se usnadnila volba dávkování.
- Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13). Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty, která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (podle kapitoly B.6 této přílohy) (13). Díky tomu metoda LLNA: BrdU-ELISA snižuje utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: BrdU-ELISA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. zkoušení některých kovů, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchové aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (15). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: BrdU-ELISA (10). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: BrdU-ELISA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: BrdU-ELISA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,6 do 1,9 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 43 látek za použití hodnot $SI \geq 1,6$ (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: BrdU-ELISA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala dvě z 11 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,6 do 1,9 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

- Základní podstata metody LLNA: BrdU-ELISA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být $\geq 1,6$, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu BrdU k indikaci zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. Látka BrdU je analogem thymidinu a začleňuje se podobným způsobem do DNA proliferujících buněk. Začlenění BrdU se měří metodou ELISA, která využívá protilátku specifickou pro BrdU, která je rovněž značí peroxidázou. Po přidání substrátu peroxidáza reaguje se substrátem při vzniku barevného produktu, jehož množství se určuje při určité absorpční za použití čtečky mikrotitračních destiček.

POPIS ZKOUŠKY**Volba druhu zvířat**

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: BrdU-ELISA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/JN, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (10) (12). Používají se mladé dospělé samice myši, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: BrdU-ELISA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (16), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzivní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvě, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: BrdU-ELISA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: BrdU-ELISA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) $> 1,6$ ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 14 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (č. CAS 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedené kritéria.
12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: BrdU-ELISA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: BrdU-ELISA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).
13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: BrdU-ELISA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (17).
15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (18). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.
16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:
- strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,
 - známé fyzikálně-chemické vlastnosti,
 - podklady ze zkoušky LLNA: BrdU-ELISA,
 - podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrolní skupina (souběžná nebo z nedávne jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.
18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (19). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (19) (20 a kapitola B.4 této přílohy). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).
19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), N,N-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejné přípravky obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.
20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílů mezi zkoušenou látkou a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (17). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: BrdU-ELISA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by měla být 100 % koncentrace zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.
22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: BrdU-ELISA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (20 a kapitola B.4 této přílohy). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibližně 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humaně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (21) (22). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvary znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (21) (22) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myši ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (25) (26) (27) (28) (29).
24. O systémové toxicitě (30) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA: změny fungování nervového systému (např. piloerectce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činnosti týkající se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humaně usmrtit (31).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

- Den 1: Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se aplikuje 25 μ l vhodné zředěné roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11 až 15).
- Den 2 a den 3: Zopakuje se postup aplikace provedení v den 1.
- Den 4: Žádná aplikace.
- Den 5: Injekčně se intraperitoneálně aplikuje 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

- Den 6: Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 hodin (24 hod.) po injekčním podání BrdU se zvířata humánně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufovému fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (17). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti částí ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 µm sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze (např. rozdrčením lymfatických uzlin za použití jednorázové plastové paličky a následným protlačením tkáně nylonovým sítkem # 70). Postup přípravy suspenze buněk z lymfatických uzlin je v této zkoušce rozhodující, a proto by si měl každý pracovník osvojit tuto dovednost předem. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. V každém případě je nutno cílový objem suspenze buněk z lymfatických uzlin upravit na stanovený optimální objem (přibližně 15 ml). Optimální objem je založen na dosažení průměrné absorpce negativní kontrolní skupiny v rozmezí 0,1–0,2.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu BrdU v DNA lymfocytů)

27. Obsah BrdU se měří metodou ELISA za použití komerční soupravy (např. Roche Applied Science, Mannheim, Německo, katalogové číslo 11 647 229 001). Postup lze stručně popsat tak, že 100 ml suspenze buněk z lymfatických uzlin se nakape do jamek tří mikrotitračních destiček s plochým dnem. Po fixaci a denaturaci buněk z lymfatických uzlin se do každé jamky přidá protilátka proti BrdU a obsah jamek se nechá zreagovat. Následně se protilátka proti BrdU odstraní vymytím, přidá se roztok substrátu a nechá se vzniknout chromogen. Pak se změří absorpce při vlnové délce 370 nm s referenční vlnovou délkou 492 nm. Ve všech případech je nutno optimalizovat zkušební podmínky (viz odstavec 26).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (31).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

Index značení BrdU je definován jako:

$$\text{Index značení BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

kde: em = vlnová délka záření; ref = referenční vlnová délka.

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota SI $\geq 1,6$ (10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,6 do 1,9) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (3) (6) (32).
32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,6 do 1,9 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myši způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito body a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovní jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem ‚odlehle hodnoty‘) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami indexu značení BrdU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou indexu značení BrdU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),
- jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),
- zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

- zdroj myší z kmene CBA,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet a věk zvířat,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy ELISA, které se týkají prokazování a kontroly kvality (citlivost a specifická detekce protilátek a mez detekce),
- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),
- použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,
- podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),
- podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,
- metody měření toxicity,

- kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,
- údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,
- údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,
- pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

- hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného humánního usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,
- u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,
- tabulka hodnot indexu značení BrdU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu;
- průměrná hodnota indexu značení BrdU na zvířete a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu,
- vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,
- závislost odezvy na dávce,
- případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49–59.

- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258–273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274–286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249–257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>].
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf].
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129–134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (33).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní (33).

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní (33).

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejné zkoušené látky získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (33).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (33).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznaček, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídící proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (33).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenů, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.“
