II

(Nelegislativní akty)

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2019/1390

ze dne 31. července 2019,

kterým se přizpůsobuje technickému pokroku příloha 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 (REACH)

(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 (REACH), 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. 2 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 [2] obsahuje zkušební metody pro účely stanovení fyzikálně-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity chemických látek, které se uplatní pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006.

(2) Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) připravuje harmonizované a mezinárodně schválené pokyny ke zkoušení chemických látek pro regulační účely. OECD pravidelně vydává nové a revidované pokyny ke zkoušení zohledňující vědecký pokrok v této oblasti.

(3) Aby bylo možné zohlednit technický pokrok a co nejvíce snížit počet zvířat používaných pro experimentální účely v souladu s čl. 13 odst. 2 nařízení (ES) č. 1907/2006, je třeba po přijetí příslušných pokynů OECD ke zkoušení stanovit dvě nové zkušební metody pro posuzování ekotoxicity a devět nových zkušebních metod pro stanovení toxicity pro lidské zdraví a aktualizovat sedm zkušebních metod. Jedenáct z těchto zkušebních metod se týká zkoušek in vitro na dráždivé/leptavé účinky na kůži a oči, senzibilizaci kůže, genotoxicitu a endokrinní účinky. Navrhovaná změna byla konzultována se zúčastněnými stranami.

[1] Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

[2] Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH) (Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1).

(4) Nařízení (ES) č. 440/2008 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.

(5) 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 dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

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

V Bruselu dne 31. července 2019.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

PŘÍLOHA

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

(1) V části B se kapitola B.4 nahrazuje tímto:

„B.4 **AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 404 (2015). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek jsou pravidelně přezkoumávány s cílem zajistit, aby odrážely nejlepší dostupné vědecké poznatky. Při přezkumu Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení se zvířaty a vyhodnocování veškerých existujících informací o zkoušené chemické látce s cílem vyhnout se zkouškám na laboratorních zvířatech, které nejsou nutné. Aktualizovaná verze Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 (původně přijatého v roce 1981, revidovaného v letech1992, 2002 a 2015) obsahuje odkaz na pokyny k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži (1) a navrhuje pro zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži modulový přístup. Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a i) poskytují návod na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek a dalších údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (1). Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje v tomto pokynu namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

2. Definice dráždivých a leptavých účinků na kůži jsou uvedeny v dodatku této zkušební metody.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje, významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky zkoušené chemické látky, vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků, jak se uvádí v pokynech k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži, tj. ve třech částech tohoto pokynu a v příslušných modulech (1). Stručně řečeno, podle části 1 se stávající údaje hodnotí v sedmi modulech zahrnujících údaje o účincích na člověka, údaje *in vivo*, údaje *in vitro*, údaje o fyzikálně chemických vlastnostech (například pH, zejména silná kyselost nebo zásaditost) a jiné než zkušební metody. Podle části 2 se provádí analýza průkaznosti výsledků. Je-li tato analýza stále neprůkazná, je třeba provést další zkoušení podle části 3, přičemž se začíná metodami *in vitro* a zkoušení *in vivo* se používá až jako poslední možnost. Tato analýza by tedy měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u zkoušených chemických látek, u nichž již existují dostatečné důkazy z jiných studií, pokud jde o tyto dvě sledované vlastnosti.

PRINCIP ZKOUŠKY IN VIVO

4. Chemická látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete; oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

5. Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a zkoušená chemická látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o humánním usmrcení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v samostatných pokynech OECD (2).

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU IN VIVO

Výběr zvířecích druhů

6. Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiného druhu by mělo být zdůvodněno.

Příprava zvířat

7. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

8. Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

Podmínky chovu a krmení

9. Zvířata se chovají samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezeným přísunem pitné vody.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Aplikace zkoušené chemické látky

10. Zkoušená chemická látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená chemická látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená chemická látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží a rovnoměrné rozložení zkoušené chemické látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou chemickou látku požilo nebo vdechlo.

11. Kapalné zkoušené chemické látky se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být případně rozetřeny na prach) se zkoušená chemická látka navlhčí co nejmenším množstvím vody (v případě potřeby jiným vhodným vehikulem), aby se zajistil dostatečný kontakt s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené chemické látky na kůži pouze minimální.

12. Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 hodiny, se odstraní zbytky zkoušené chemické látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

Úroveň dávek

13. Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné látky nebo pasty.

Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo* s použitím jednoho zvířete)

14. Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků nebo na základě předchozího zkoušení *in vitro* zkoušená chemická látka posouzena jako žíravá, dráždivá nebo neklasifikovaná, není žádné další zkoušení *in vivo* obvykle nutné. Avšak v případech, kdy je opodstatněné získat doplňující údaje, provede se zkouška *in vivo* nejprve na jednom zvířeti a s použitím následujícího přístupu. Zvířeti se postupně přiloží tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, přiloží se na jiné místo druhá náplast a po jedné hodině se odstraní. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

15. Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, zvíře se pozoruje po dobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

16. V takových případech, kdy se u zkoušené chemické látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži *in vivo* s dalšími zvířaty)

17. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit nejvýše na dvou dalších zvířatech, u každého s jednou náplastí a dobou expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí zvíře. Neurčité reakce je možné zhodnotit na dalších zvířatech.

Doba pozorování

18. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže

19. Všechna zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému, reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění náplasti. V počáteční zkoušce na jednom zvířeti se po odstranění náplasti okamžitě vyšetří také testované místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 hodinách nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pokračovat v pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Kromě pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). K objasnění neurčitých reakcí se zváží histopatologické vyšetření.

20. Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebním laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí (3).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

21. Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečné zprávě. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v odstavci 24.

Vyhodnocení výsledků

22. Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a závažností lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

23. Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená chemická látka za dráždivou.

Závěrečná Zpráva

24. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

Odůvodnění zkoušení in vivo:

— analýza průkaznosti výsledků údajů z dřívějších zkoušek, včetně výsledků strategie postupného zkoušení, s posouzením závažnosti důkazů,

— popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,

— údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,

— popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,

— analýza závažnosti důkazů odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená chemická látka:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,

— vícesložková látka, směs a látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologické materiály (UVCB): charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušených chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albinotický králík,

— počet zvířat každého pohlaví,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,

— stáří na začátku studie,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast;

— podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

— údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého zvířete v každém okamžiku měření,

— popis všech pozorovaných lézí,

— podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,

— popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/ Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Tabulka

Hodnocení kožních reakcí

Tvorba erytému a příškvaru

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

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění neurčitých reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

Dodatek

DEFINICE

Chemická látka je látka nebo směs.

Dráždivé účinky na kůži znamenají vyvolání vratných změn na kůži do 4 hodin po aplikaci zkoušené chemické látky.

Leptavé účinky na kůži znamenají vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Typickými reakcemi na poleptání jsou vředy, krvácení, krvavé strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztráta barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplná ložiska alopecie a jizvy. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.“

(2) V části B se kapitola B.17 nahrazuje tímto:

„B.17 **ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENŮ HPRT A XPRT**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 476 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Současná revidovaná verze zkušební metody B.17 odráží téměř třicet let zkušeností s touto zkouškou a vyplývá také z vývoje samostatné nové metody určené pro zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* s použitím genu thymidinkinázy. Zkušební metoda B.17 je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací vyvolaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázového genu (Hprt v buňkách hlodavců, HPRT v lidských buňkách; v této zkušební metodě dále jen společně gen Hprt a zkouška HPRT) a xanthin-guaninfosforibosyltransferázového transgenu (gpt) (dále jen zkouška XPRT). Zkoušky na mutace HPRT a XPRT detekují různé spektrum genetických událostí. Kromě mutací detekovaných zkouškou HPRT (např. substituce párů bází, posunové mutace, malé delece a inserce) může autosomální lokace transgenu gpt umožnit detekci mutací vzniklých z velkých delecí a případně mitotickou rekombinaci nezjištěnou zkouškou HPRT, protože se gen Hprt nachází v chromozomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Pro účely regulace se zkouška XPRT v současnosti používá méně často než zkouška HPRT.

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.

5. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny přímou interakcí mezi zkoušenými chemickými látkami a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality (8) (9) (10), interakci se složkami média (11) (12) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (13). Pro zkoušku HPRT se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 19 považuje za nadměrnou.

6. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PRINCIP ZKOUŠKY

7. Mutantní buňky s deficientní aktivitou enzymu Hprt při zkoušce HPRT nebo deficientní aktivitou enzymu xprt při zkoušce XPRT jsou rezistentní na cytostatické účinky 6-thioguaninu (TG), což je analog purinů. Buňky produkující Hprt (při zkoušce HPRT) nebo gpt (při zkoušce XPRT) jsou citlivé na TG, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TG, zatímco normální buňky, které obsahují enzym Hprt (při zkoušce HPRT) nebo enzym gpt (při zkoušce XPRT), tuto schopnost nemají.

8. Buňky v suspenzní nebo jednovrstevné kultuře jsou po vhodnou dobu (3–6 hodin) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivace (viz odstavec 14), tak bez něj, a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů (14), (15), (16), (17). Cytotoxicita se stanoví podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování měřené okamžitě po expozici a upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s negativní kontrolou (odstavec 18 a dodatek 2). Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý typ buněk, aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací (obvykle 7–9 dnů). Po fenotypové expresi se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

9. Typy buněk použité pro zkoušky HPRT a XPRT by měly vykazovat citlivost k chemickým mutagenům, vysokou klonovací schopnost, stabilní karyotyp a stabilní frekvenci spontánních mutací. Mezi nejčastěji používané buňky pro zkoušku HPRT patří buněčné linie CHO, CHL a V79 křečka čínského, buňky lymfomu L5178Y myší a lymfoblastoidní buňky TK6 člověka (18) (19). Pro zkoušku XPRT se používají buňky AS52 odvozené z vaječníků křečka čínského obsahující transgen gpt (a které mají deletovaný gen Hprt) (20) (21); zkoušku HPRT nelze na buňkách AS52 provést, protože gen hprt je deletován. Použití jiných buněčných linií by mělo být zdůvodněno a validováno.

10. U buněčných linií by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty (22) (23). Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Měla by být stanovena normální délka buněčného cyklu použitá ve zkušební laboratoři, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře. Rovněž by měla být zkontrolována spontánní četnost mutací v zásobě základních buněk, a pokud četnost mutantů není přijatelná, zásoba by se neměla používat.

11. Před použitím v této zkoušce může být nezbytné odstranit z kultury již přítomné mutantní buňky, např. kultivací v médiu HAT pro zkoušku HPRT a v médiu MPA pro zkoušku XPRT (5) (24) (viz dodatek 1). Vyčištěné buňky mohou být uchovávány zmrazené a po rozmrazení použity jako pracovní zásoby. Právě rozmrazená pracovní zásoba může být použita pro zkoušku po dosažení normální rychlosti rozmnožování. Při provádění zkoušky XPRT by měla být rutinní kultura buněk AS52 použita za podmínek, které zajišťují zachování transgenu gpt (20).

Média a podmínky kultivace

12. Pro udržování kultur by mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, inkubační teplota 37 °C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité, aby byly média a podmínky kultivace zvoleny tak, aby byl zajištěn optimální růst buněk během období exprese a optimální účinnost klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk.

Příprava kultur

13. Buněčné linie se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby u buněk v suspenzích nebo v monovrstvách pokračoval exponenciální růst v průběhu doby expozice a exprese (např. mělo by se zamezit konfluenci u buněk rostoucích v monovrstvách).

Metabolická aktivace

14. Při použití buněk, které mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost, by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), nebo směsí fenobarbitalu a β-naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Uvedená směs není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (33) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (29) (31). Frakce S9 je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích od 1 % do 2 % obj., avšak koncentraci je možné zvýšit do 10 %. Volbu oprávněného typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených látek (34) (35) (36).

Příprava zkoušené chemické látky

15. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 16). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (37) (38). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

16. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou například voda a dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami a zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxické. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

Měření cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

17. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odezvu, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 20), srážení kultivačního média (viz odstavec 21) nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 5). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, lze pH upravit pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

18. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 20–22). Přestože hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).

19. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních nezávislých kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (17). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené zkušební koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti účinku na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost účinku na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 43). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.

20. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 %. Je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány při relativním přežití 10 % nebo méně (odstavec 43).

21. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Při koncentraci, kdy vzniká sraženina, je třeba dbát na to, aby sraženina nemohla ovlivňovat provádění zkoušky. Užitečné může být stanovit rozpustnost v kultivačním médiu před pokusem.

22. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (39) (40). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)) (41), přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (42).

Kontroly

23. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 16) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.

24. Souběžné pozitivní kontroly jsou nutné pro prokázání schopnosti laboratoře identifikovat mutageny za daných experimentálních podmínek a případně pro prokázání účinnosti exogenního systému metabolické aktivace. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož jsou zkoušky na buňkách savců *in vitro* za účelem stanovení genetické toxicity dostatečně standardizovány, mohou být provedeny zkoušky s použitím expozice s exogenní metabolickou aktivací a bez exogenní metabolické aktivace za použití pouze pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 20).

Tabulka 1

Referenční látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol

Stav metabolické aktivace	Lokus	Látka a číslo CAS
Bez vnější metabolické aktivace	*Hprt*	ethyl-methansulfonát [CAS č. 62-50-0] 1-ethyl-1-nitrosomočovina [CAS č. 759-73-9] 4-nitrochinolin-1-oxid [CAS č. 56-57-5]
	xprt	streptonigrin [CAS č. 3930-19-6] mitomycin C [CAS č. 50-07-7]
S vnější metabolickou aktivací	*Hprt*	3-methylcholanthren [CAS č. 56-49-5] 7,12-dimethylbenzoanthracen [CAS č. 57-97-6] Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]
	xprt	Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látce

25. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 6 hodin).

26. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat dostatečný počet buněk, aby bylo v každé kultuře uchováno v každé fázi zkoušky 10 spontánních mutantů (17). Četnost spontánních mutací obvykle činí 5 až 20×10^{-6}. Aby byl při četnosti spontánních mutací 5×10^{-6} uchován dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90 % cytotoxicitu (10 % relativní přežití), bylo by nutné exponovat alespoň 20×10^{6} buněk. Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (nikdy však méně než 2 miliony) (17).

Doba exprese fenotypu a měření četnosti mutací

27. Na konci doby expozice se buňky kultivují za účelem umožnění exprese fenotypu mutanta. Obecně postačí minimálně 7 až 9 dnů, aby došlo k přibližně optimální fenotypové expresi nově indukovaných mutantů Hprt a xprt (43) (44). Během této doby jsou buňky pravidelně subkultivovány, aby se udržely ve fázi exponenciálního růstu. Po fenotypové expresi jsou buňky opět kultivovány v médiu se selekčním činidlem (6-thioguanin) a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů, respektive účinnosti klonování v době selekce. Tato kultivace může být provedena pomocí misek u kultur v monovrstvách nebo pomocí mikrotitračních destiček u buněk v suspenzi. Pro selekci mutantů je třeba buňky kultivovat v takové hustotě, aby byla zajištěna optimální obnova mutací (tj. aby nedošlo k metabolické kooperaci) (17). Destičky se inkubují po dobu vhodnou pro optimální růst kolonií (např. 7–12 dnů) a kolonie se spočítají. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

Způsobilost laboratoře

28. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (s použitím různých rozpouštědel/vehikul). Odezvy těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 30 až 33.

29. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1 v odstavci 25) by měl být zkoumán bez metabolické aktivace a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobilost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovení účinnosti systému metabolické aktivace a prokázání vhodnosti podmínek pro růst buněk v průběhu expozice, fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

30. Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

31. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji (22). S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by být souběžné negativní kontroly v ideálním případě uvnitř 95 % kontrolních limitů této distribuce (17) (45) (46).

32. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly kvality, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (47)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (46). Další doporučení, jak získat a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (45).

33. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 23. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly spadat mezi 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře (17) (45) (46). Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existují důkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz výše), a důkazy o tom, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

34. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávající historickou kontrolní databází laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

35. Předložené výsledky by měly zahrnovat všechny údaje potřebné k výpočtu cytotoxicity (vyjádřené jako relativní přežití). Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat počet buněk na konci expozice, počet buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici a počet kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody). Relativní přežití u každé kultury by mělo být vyjádřeno jako procento ve vztahu k souběžné kontrole s rozpouštědlem (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).

36. Předložené výsledky by měly zahrnovat také všechny údaje potřebné k výpočtu četnosti mutací. Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat: 1) počet buněk umístěných na destičky se selekčním činidlem a bez něj (v době, kdy jsou buňky umístěny na destičky pro selekci mutantů) a 2) počet spočtených kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody) z destiček se selekčním činitelem a bez něj. Četnost mutací se vypočítá podle počtu mutantních kolonií (na destičkách se selekčním činidlem) korigovaného účinností klonování (z destiček bez selekčního činidla). Četnost mutací by měla být vyjádřena jako počet mutantů na milion životaschopných buněk (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).

37. Měly by se uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.

Kritéria přijatelnosti

38. Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

— souběžná negativní kontrola je považována za přijatelnou pro přidání do historické databáze negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 33,

— souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 24) by měly vyvolat odezvy, které jsou slučitelné s odezvami uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— test se provede při dvou experimentálních uspořádáních (tj. s metabolickou aktivací a bez ní), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům (viz odstavec 25),

— analyzovatelný je adekvátní počet buněk a koncentrací (odstavce 25, 26 a 19),

— kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 20, 21 a 22.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některé ze zkoumaných experimentálních uspořádání:

— alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci,

— všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (46) (48).

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, je zkoušená chemická látka považována za jasně negativní, pokud ve všech zkoumaných zkušebních podmínkách:

— žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže, že nedochází k nárůstu účinku v závislosti na koncentraci,

— všechny výsledky spadají do rámce distribuce historických údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy není nutné.

42. V případech, kdy odezva není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku, by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek (např. rozsah koncentrací, jiné podmínky metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odezva na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odezvy).

Závěrečná Zpráva

44. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované v co možná nejvyšší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

— druh a zdroj buněčných linií,

— počet pasáží, je-li k dispozici, a historie v laboratoři,

— vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,

— metody udržování buněčných kultur,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

— odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,

— složení média, koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v µg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoušené chemické látky přidaných do kultivačního média,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— trvání expozice,

— hustota buněk během expozice,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy

— směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),

— látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,

— délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),

— identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,

— kritéria přijatelnosti zkoušek,

— metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk;

— metody použité pro měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— délka inkubace po umístění na destičky;

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou;

— metody použité ke stanovení pH, osmolality a sraženiny.

Výsledky:

— počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,

— měření cytotoxicity, případně další pozorování,

— známky srážení a čas jejich stanovení,

— počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu;

— počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),

— historické údaje o negativních (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a interval spolehlivosti (např. 95 %) a rovněž počet údajů,

— statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty.

Diskuse o výsledcích.

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24):9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) 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. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) 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.

(32) 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.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupné na internetových stránkách: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(38) 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. Mutagen. 5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). K dispozici na požádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Dostupné na internetových stránkách: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

DEFINICE

Mutageny substituce párů bází: chemické látky, které způsobují substituci párů bází v DNA.

Chemická látka: látka nebo směs.

Účinnost klonování: procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Koncentrace: odkazuje na konečné koncentrace zkoušené chemické látky v kultivačním médiu.

Cytotoxicita: u zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního přežití exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz zvláštní odstavec).

Přímá mutace: genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: chemické látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

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

HAT médium: médium obsahující hypoxanthin, aminopterin a thymidin, které se používá na čištění mutantů Hprt.

Mitotická rekombinace: rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k vyvolání zlomů dvojvláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

MPA médium: médium obsahující xanthin, adenin, thymidin, aminopterin a kyselinu mykofenolovou, které se používá na čištění mutantů Xprt.

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

Četnost mutací: počet pozorovaných kolonií mutací dělený počtem buněk kultivovaných v selektivním médiu, korigovaný účinností klonování (nebo životaschopností) v době selekce.

Doba exprese fenotypu: doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová vlastnost.

Relativní přežití: relativní přežití se používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Relativní přežití je účinnost klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %).

Jaterní frakce S9: supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000 g, tj. surový jaterní extrakt.

Směs S9: směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Kontrola s rozpouštědlem: obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Neexponovaná kontrola: kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se souběžně stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Dodatek 2

VZORCE PRO STANOVENÍ CYTOTOXICITY A ČETNOSTI MUTACÍ

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz vzorec pro relativní přežití níže).

Upravená účinnost klonování u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{Počet bunek na konci expozice}}{\text{Počet buněk na počátku expozice}}$$

Relativní přežití (RS) u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$\text{RS} = \frac{\text{Upravená CE vexponované kultuře}}{\text{Upravená CE vkontrole srozpouštědlem}} \times 100$$

Četnost mutací je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu děleno účinností klonování v neselektivním médiu, měřená u stejné kultury v době selekce.

$$\text{Četnost mutací} = \frac{\text{Účinnost klonování kolonií mutací vselektivním médiu}}{\text{Účinnost klonování kolonií vne selektivním médiu}}$$

Když se pro účinnost klonování používají destičky:

CE = počet kolonií / počet buněk umístěných na destičky.

Když se pro účinnost klonování používají mikrotitrační destičky:

Počet kolonií na jamku v mikrotitračních destičkách odpovídá Poissonovu rozdělení.

Účinnost klonování = –ln P(0) / počet buněk na jamku,

kde –ln P(0) je pravděpodobný počet prázdných jamek z počtu jamek s nasazenými buňkami a popisuje se tímto vzorcem:

ln P(0)= –ln (počet prázdných jamek / počet jamek s buňkami)“

(3) V části B se kapitola B.22 nahrazuje tímto:

„B.22 **DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 478 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží více než třicet let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými zkouškami toxicity, jako jsou studie vývojové toxicity, studie reprodukční toxicity nebo studie genotoxicity; avšak vzhledem k omezením této zkoušky a používání velkého počtu zvířat není zkouška určena pro použití jako hlavní metoda, ale spíše jako doplňková zkušební metoda, kterou lze použít pouze v případě, že regulatorní požadavky nelze splnit alternativním způsobem. Kombinování zkoušek toxicity může ušetřit použití velkého počtu zvířat na zkoušky toxicity. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky dominantní letality (DL) je zkoumat, zda chemické látky vytvářejí mutace vznikající z chromozomových aberací v zárodečných buňkách. Zkouška dominantní letality je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhají procesy aktivního metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látce naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné tkáně zkušebního zvířete.

3. Dominantní letální mutace způsobují embryonální nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látce naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné buňky zkušebního zvířete.

4. Zkouška dominantní letality je užitečná pro potvrzení pozitivních výsledků zkoušek používajících somatické sledované vlastnosti *in vivo* a je významnou sledovanou vlastností pro predikci nebezpečnosti pro člověka a rizika genetických onemocnění přenášených prostřednictvím zárodečných buněk. Tato zkouška však vyžaduje velký počet zvířat a je velmi pracná; proto je velmi nákladná a časově náročná na provedení. Protože je spontánní četnost dominantních letálních mutací celkem vysoká, je citlivost zkoušky na detekci malých nárůstů četnosti mutací obvykle omezená.

5. Definice nejdůležitějších termínů jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Zkouška se nejčastěji provádí na myších (2) (3) (4), avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy, například potkani (5) (6) (7) (8). Dominantní letalita je obecně výsledkem velkých chromozomových aberací (strukturálních a numerických abnormalit) (9) (10) (11), ale nelze vyloučit ani genové mutace. Dominantní letální mutace je mutace vyskytující se v zárodečné buňce jako taková nebo vzniká po oplodnění v raném embryu, nepůsobí dysfunkci gamety, ale je letální pro oplodněné vajíčko nebo vyvíjející se embryo.

7. Jednotliví samci jsou ve vhodných intervalech opakovaně kříženi s dosud nepřipuštěnými samicemi. Počet páření po expozici závisí na konečném účelu studie dominantní letality (odstavec 23) a měl by zajišťovat, aby byla dominantní letalita hodnocena ve všech stádiích zrání samčích zárodečných buněk (12).

8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKOUŠKY

9. Samci jsou zpravidla vhodnou cestou exponováni zkoušené chemické látce a pářeni s neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi. Různé druhy zárodečných buněk mohou být testovány použitím po sobě jdoucích intervalů páření. Po páření se samice po uplynutí vhodné doby utratí a obsah dělohy se vyšetří za účelem určení počtu implantací a živých a mrtvých embryí. Dominantní letalita zkoušené chemické látky se stanoví porovnáním počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině vehikulum/rozpouštědlo. Nárůst mrtvých implantací na samici v exponované skupině nad počet mrtvých implantací na samici v kontrolní skupině odpovídá postimplantačním ztrátám indukovaným zkoušenou chemickou látkou. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině. Preimplantační ztráty lze odhadnout porovnáním počtu žlutých tělísek minus celkový počet implantací nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat četnost dominantní letality ze zveřejněných údajů (např. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a kontrolami vehikula a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí údajů (viz výše uvedené odkazy) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých pohlavně dospělých zvířat. Běžně se používá myš, ale vhodný může být také potkan. Použit může být i jakýkoli jiný vhodný druh savce, je-li ve zprávě poskytnuto vědecké zdůvodnění.

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Před expozicí nebo pářením by hlodavci měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti) téhož pohlaví, pokud se nepředpokládá nebo není pozorováno agresivní chování, přednostně v pevných klecích s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

13. Zdraví a pohlavně zralí samci a dospělé samice se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím prstu dolní končetiny nebo ucha) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla/vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro souběžné pozitivní kontroly. Zvířata v pozitivní kontrolní skupině však nemusí být exponována stejným způsobem jako zvířata, kterým je podávána zkoušená chemická látka, a vzorky u nich nemusí být odebírány při všech intervalech páření. Látky používané pro pozitivní kontrolu by měly prokazatelně vyvolávat dominantní letalitu za podmínek používaných pro tuto zkoušku. S výjimkou expozice by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

17. Dávky pozitivních kontrolních látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly slabé nebo mírné účinky, které nejlépe dokládají správné provedení a citlivost zkoušky, ale které soustavně vyvolávají pozitivní dominantní letální účinky. Příklady pozitivních kontrolních látek a vhodných dávek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady látek pro pozitivní kontroly

Látka [č. CAS] (referenční č.)	Rozpětí efektivní dávky (mg/kg) (druhy hlodavců)	Délka podávání (dny)
triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (myš)	1
cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (myš)	5
cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (potkan)	1
ethyl-methansulfonát [62-50-0] (13)	100–300 (myš)	5
monomer akrylamidu [79-06-1] (17)	50 (myš)	5
chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (myš)	1

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami (20). Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné dominantní letální nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP

Počet zvířat

19. Jednotliví samci jsou ve vhodně stanovených intervalech (např. týdenní intervaly, odstavce 21 a 23) opakovaně kříženi nejlépe s jednou dosud nepřipuštěnou samicí. Počet samců ve skupině by měl být stanoven předem tak, aby stačil (v kombinaci s počtem připuštěných samic v každém intervalu páření) k dosažení statistické síly nezbytné pro zjištění nejméně zdvojnásobení četnosti dominantní letality (odstavec 44).

20. Také počet samic na jeden interval páření by měl být podle výpočtů statistické síly stanoven předem tak, aby umožnil zjištění nejméně dvojnásobné četnosti dominantní letality (tj. dostatečný počet březích samic, aby bylo možné získat alespoň 400 implantací celkem) (20) (21) (22) (23) a aby bylo možné očekávat alespoň jeden mrtvý zárodek na jednu jednotku analýzy (tj. skupina páření na jednu dávku) (24).

Doba podávání a intervaly páření

21. Počet intervalů páření po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla hodnocena indukce dominantní letality ve všech fázích dozrávání samčích zárodečných buněk (12) (25). U jednorázového podání maximálně 5 denních dávek je třeba, aby došlo k 8 (myš) nebo 10 (potkan) páření v týdenních intervalech po poslední expozici. U podání většího počtu dávek se může počet intervalů páření snížit poměrně k delší době podávání, je však třeba zachovat cíl hodnocení všech fází spermatogeneze (např. po 28denní expozici postačí pouze 4 páření jednou týdně, aby bylo možné vyhodnotit všechny fáze spermatogeneze u myší). Všechny plány expozice a páření by měly být vědecky zdůvodněny.

22. Samice musí být u samců ponechány nejméně po dobu trvání jednoho estrálního cyklu (např. jeden týden zahrnuje jeden estrální cyklus u myší i potkanů). Samice, které se nepářily v týdenním intervalu, lze použít pro následující interval páření. Nebo dokud nedojde ke spáření prokázanému spermiemi ve vagíně nebo přítomností vaginální zátky.

23. Použitý režim expozice a páření závisí na konečném účelu studie dominantní letality. Jestliže je cílem stanovit, zda daná chemická látka indukuje dominantní letální mutace jako takové, vhodnou metodou je expozice po celý cyklus spermatogeneze (např. 7 týdnů u myší, 5–7 expozicí týdně) a jedno páření na konci. Jestliže je však cílem identifikovat citlivý typ zárodečných buněk pro indukci dominantní letality, je lepší jednorázová nebo 5denní expozice, po níž následuje jedno páření týdně.

Dávkování

24. Jestliže se provádí předběžná studie pro stanovení rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje, jež by mohly při stanovení dávek pomoci, pak by měla být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (26). Cílem studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku, která je definována jako nejvyšší dávka, která bude po dobu trvání zkoušky tolerována bez příznaků toxicity omezující studii (např. abnormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicity hematopoetického systému), avšak nikoli smrti nebo příznaků bolesti, utrpení nebo strádání, kdy je nezbytné zvířata humánně utratit (27).

25. Maximální tolerovaná dávka dále nesmí negativně ovlivnit úspěch páření (21).

26. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.

27. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. U netoxických chemických látek je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní nebo delší, nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

Podávání dávek

28. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, subkutánně, nitrožilně, lokálně, inhalací, orálně (pomocí žaludeční sondy) nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obvykle nedoporučují, protože se nejedná o předpokládanou cestu expozice člověka, a měly by být použity pouze s konkrétním vědeckým zdůvodněním. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a pářením by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (odstavec 31). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se na všech úrovních dávek zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti.

Pozorování

29. Všeobecné klinické pozorování a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně po dobu podávání dávek by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie a nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (27).

Odběr a zpracování tkání

30. Samice se utratí v druhé polovině březosti, v 13. den gestace u myší a v 14.–15. den gestace u potkanů. Dělohy se vyšetří za účelem stanovení dominantních letálních účinků a určí se počet implantací, živých a mrtvých embryí a žlutých tělísek.

31. Obnaží se děložní rohy a vaječníky za účelem spočítání žlutých tělísek a plody se vyjmou, spočítají a zváží. Dělohy je třeba pečlivě vyšetřit, aby se nepřehlédly resorpce zakryté živými plody a aby bylo zajištěno, že budou všechny resorpce vyčísleny. Zaznamená se fetální mortalita. Dále se zaznamená počet úspěšně oplodněných samic a počet celkových implantací, preimplantačních ztrát a postimplantační mortalita (včetně časných a pozdních resorpcí). Kromě toho mohou být viditelné plody uchovány v Bouinově fixačním roztoku po dobu alespoň 2 týdnů, po nichž se prohlédnou, zda nevykazují větší vnější malformace (28), což poskytne další informace o reprodukčních a vývojových účincích zkoušené látky.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

32. Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet připuštěných samců, počet březích samic a počet nezabřezlých samic. Samostatně se uvedou výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice. Pro každou samici se uvede interval páření, dávka, kterou obdržel samec, a počet živých a mrtvých implantací.

33. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím z exponované skupiny v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím z kontrolní skupiny vehikulum/rozpouštědlo.

34. Preimplantační ztráty se vypočítají jako rozdíl mezi počtem žlutých tělísek a počtem implantací nebo jako snížení průměrného počtu implantací na samici ve srovnání s kontrolou. Odhadují-li se také preimplantační ztráty, uvedou se.

35. Dominantní letální faktor se odhadne jako: (postimplantační úhyn / celkové implantace na samici) × 100.

36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 29).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.

— Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).

— Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které jsou v souladu s publikovanými normami pro historické údaje o pozitivní kontrole nebo historickými pozitivními kontrolními údaji laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17 a 18).

— Byl analyzován přiměřený počet celkových implantací a dávek (odstavec 20).

— Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 24 a 27.

Hodnocení a interpretace výsledků

38. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.

39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

— alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— při hodnocení pomocí vhodného testu je tento nárůst alespoň pro jedno experimentální uspořádání závislý na dávce (např. interval páření jednou týdně), a

— všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod jsou popsána v odstavci 44; v literatuře lze nalézt také další doporučené statistické přístupy (20) (21) (22) (24) (29). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

— žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a

— všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

42. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), údaje by měly být vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (30).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

44. Použité statistické testy by měly brát v úvahu samce jako experimentální jednotku. I když je možné, že údaje o počtech (např. počet implantací na samici) mohou vykazovat Poissonovo rozdělení anebo podíly (např. podíl mrtvých implantací) mohou mít binomické rozdělení, často se stává, že jsou tyto údaje příliš rozptýlené (31). Podobně při statistické analýze by měl být nejprve použit test na nadměrný/nedostatečný rozptyl pomocí takových testů rozptylu, jako je Cochranův binomický test rozptylu (32) nebo Taroneho C(α) test nadměrného binomického rozptylu (31) (33). Není-li zjištěna žádná odchylka od binomického rozptylu, mohou být testovány trendy podílů jednotlivých úrovní dávky pomocí Cochranova-Armitageova trend-testu (34) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována pomocí Fisherova exaktního testu (35). Podobně, není-li zjištěna žádná odchylka od Poissonova rozptylu, mohou být trendy počtů testovány pomocí Poissonovy regrese (36) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována v rámci Poissonova modelu s využitím párových kontrastů (36). Je-li zjištěn významný nadměrný nebo nedostatečný rozptyl, doporučují se neparametrické metody (23) (31). Zahrnují pořadové testy, jako jsou Jonckheerův-Terpstrův test trendů (37) a Mannovy-Whitneyovy testy (38) pro párová porovnání s kontrolní skupinou vehikulum/rozpouštědlo, jakož i permutační testy, převzorkování nebo bootstrap testy trendů a párová porovnání s kontrolní skupinou (31) (39).

45. Pozitivní zkouška dominantní letality poskytuje průkaz genotoxicity zkoušené chemické látky v zárodečných buňkách exponovaného samce pokusného druhu.

46. Při hodnocení biologického významu odezvy může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (40).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

47. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), jsou-li prováděna.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,

— počet, věk a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých samců na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

— skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby;

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobnosti o úpravě klecového prostředí,

— podrobný popis harmonogramů expozice a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— metoda analgeze,

— způsob utracení,

— postupy izolace a uchovávání tkání,

— zdroje a čísla šarží všech sad a chemických činidel (je-li to relevantní),

— metody počítání dominantních letálních účinků,

— plán páření,

— metody průkazu spáření,

— doba utracení,

— kritéria hodnocení dominantních letálních účinků, včetně žlutých tělísek, implantací, resorpcí a preimplantačních ztrát, živých implantací, mrtvých implantací.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— hmotnosti jednotlivých samců během expozice a období páření,

— počet připuštěných samic,

— podle možnosti závislost odezvy na dávce,

— souběžné a historické údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole,

— údaje ve formě tabulky o každé samici včetně: počet žlutých tělísek na samici, počet implantací na samici, počet resorpcí a preimplantačních ztrát na samici, počet živých implantací na samici, počet mrtvých implantací na samici, hmotnosti plodů,

— výše uvedené údaje shrnuté pro každé období páření a dávku s četností dominantní letality,

— použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích.

Závěr.

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.,* 39, 173-185

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol.,* 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. v *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Edss.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

Žluté tělísko: struktura hormonální sekrece vytvořená na vaječníku v místě folikulu, z nějž se uvolnilo vajíčko. Počet žlutých tělísek ve vaječnících odpovídá počtu vajíček, které byly uvolněny z vaječníku.

Dominantní letální mutace: mutace, k níž došlo v zárodečné buňce nebo která vznikla po oplodnění a která působí úmrtí embrya nebo plodu.

Plodnost: počet připuštěných březích samic z počtu připuštěných samic.

Interval páření: doba mezi koncem expozice a pářením exponovaných samců. Kontrolováním tohoto intervalu lze hodnotit účinky chemické látky na různé druhy zárodečných buněk. U myší pářících se v průběhu týdne 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 po ukončení expozice se měří účinky na sperma, kondenzované spermatidy, kulaté spermatidy, pachyténní spermatocyty, rané spermatocyty, diferencované spermatogonie, diferencující se spermatogonie a spermatogoniální kmenové buňky.

Preimplantační ztráty: rozdíl mezi počtem implantací a počtem žlutých tělísek. Lze je také odhadnout porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

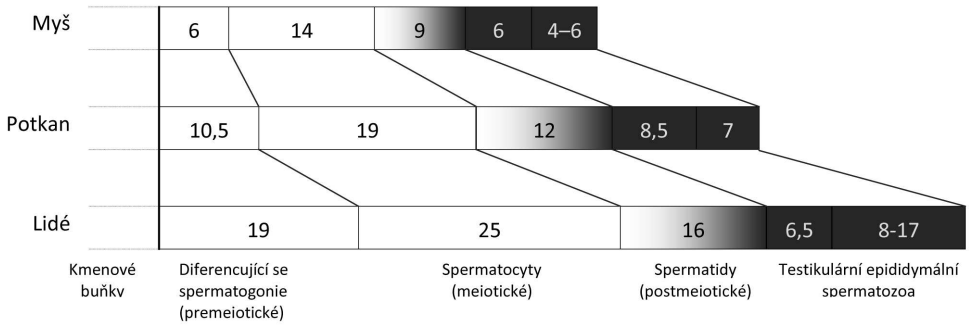
Postimplantační ztráty: poměr mrtvých implantací v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: chemická látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál.

Dodatek 2

NAČASOVÁNÍ SPERMATOGENEZE U SAVCŮ



Obr. 1: Srovnání délky (ve dnech) vývoje samčích zárodečných buněk u myší, potkanů a člověka. V průběhu dob vyznačených stínováním nedochází k opravě DNA.

Výše je znázorněno schéma spermatogeneze u myší, potkanů a u člověka (převzato z Adler, 1996). Nediferencované spermatogonie zahrnují: spermatogonie A_s (single), spermatogonie A_p (paired), a spermatogonie A_{al} (aligned) (Hess and de Franca, 2008). Spermatogonie A_s se považují za pravé kmenové buňky, aby tedy bylo možné posoudit účinky na kmenové buňky, musí uplynout alespoň 49 dnů (u myší) mezi poslední injekcí zkoušené chemické látky a pářením.

Odkazy

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

(4) V části B se kapitola B.23 nahrazuje tímto:

„B.23 **ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 483 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží mnoho let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými studiemi toxicity nebo genotoxicity. Kombinování studií toxicity může snížit počty zvířat používaných na zkoušky toxicity. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky na chromozomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* je identifikovat takové chemické látky, které způsobují strukturní chromozomové aberace ve spermatogoniích savců (2) (3) (4). Zkouška je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhá aktivní metabolismus *in vivo*, farmakokinetika a procesy reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Tato zkušební metoda není určena k měření numerických abnormalit; k tomuto účelu se tato zkouška nepoužívá rutinně.

3. Touto zkouškou se stanovují strukturní chromozomové aberace (chromozomového i chromatidového typu) v dělících se spermatogoniálních zárodečných buňkách a předpokládá se tedy, že tato zkouška poskytne předpověď indukce dědičných mutací v těchto zárodečných buňkách.

4. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Při této zkoušce jsou běžně používáni hlodavci, avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy. Standardní cytogenetické preparáty z varlat hlodavců generují mitotické (spermatogonie) a meiotické (spermatocyt) metafáze. Mitotické a meiotické metafáze se identifikují podle morfologie chromozomů (4). Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují strukturní chromozomové aberace při mitóze spermatogonií. Jiné cílové buňky nejsou předmětem této zkušební metody.

6. Pro detekci aberací chromatidového typu ve spermatogoniích by mělo být vyšetřeno první mitotické buněčné dělení, které následuje po expozici, než se tyto aberace přemění při dalším buněčném dělení na aberace chromozomového typu. Další informace z exponovaných spermatocytů lze získat meiotickou chromozomovou analýzou strukturních aberací chromozomového typu v diakinese-metafázi I a metafázi II.

7. Ve varlatech je přítomna řada generací spermatogonií (5), přičemž tyto různé druhy zárodečných buněk mohou mít různou citlivost na expozici chemické látce. Detekované aberace tedy představují souhrnnou odezvu exponovaných populací spermatogonií. Většinu mitotických buněk v preparátech z varlat tvoří spermatogonie B, které mají buněčný cyklus přibližně 26 hodin (3).

8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

9. Zvířata jsou obvykle vhodným způsobem exponována zkoušené chemické látce a po vhodné době po expozici utracena. Před utracením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemid®). Ze zárodečných buněk se poté připraví preparáty chromozomů, obarví se a analyzují se chromozomové aberace metafázujících buněk.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat očekávané výsledky četností strukturních chromozomálních aberací ve spermatogoniích s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí kontrolních údajů v publikované literatuře (např. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých mladých pohlavně dospělých zvířat. Obvykle se používají myší samci; mohou však být použiti i samci jiných vhodných savců, je-li to vědecky zdůvodněno a jestliže to umožňuje provedení této zkoušky ve spojení s jinou zkušební metodou. Vědecké zdůvodnění použití jiných druhů než hlodavců by mělo být uvedeno ve zprávě.

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Hlodavci by měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti v každé kleci), pokud se nepředpokládá agresivní chování, přednostně v klecích s pevnou podlahou s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

13. Obvykle se používají zdraví mladí dospělí samci (ve stáří 8–12 týdnů na začátku expozice), kteří se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím ucha nebo prstu dolní končetiny) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 %.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky - rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a nemělo by být schopno chemické reakce se zkoušenými chemickými látkami. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej. Neexistují-li historické nebo publikované kontrolní údaje prokazující, že zvolené atypické rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné strukturní chromozomové aberace a jiné zhoubné účinky, měla by být provedena počáteční studie za účelem stanovení přijatelnosti kontroly s tímto rozpouštědlem/vehikulem.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro souběžné pozitivní kontroly. Není-li zařazena souběžná pozitivní kontrolní skupina, měly by být v každém experimentu zařazeny hodnotící kontroly (fixované a neobarvené preparáty). Tyto hodnotící kontroly lze získat tak, že se do hodnocení studie zařadí vhodné referenční vzorky, které byly získány a uchovány ze samostatného experimentu s pozitivními kontrolami prováděného pravidelně (např. každých 6–18 měsíců) v laboratoři, kde se provádí daná zkouška; například během testování způsobilosti a poté pravidelně podle potřeby.

17. Látky pro pozitivní kontrolu by měly spolehlivě vyvolat pozorovatelné zvýšení výskytů buněk se strukturními chromozomovými aberacemi nad spontánní úrovně. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byly účinky zřetelné, ale aby hodnotitel okamžitě nezjistil identitu kódovaného preparátu. Příklady pozitivních kontrolních látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady látek pro pozitivní kontroly

Látky [č. CAS] (referenční číslo)
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát) [CAS č. 50-18-0 (CAS č. 6055-19-2)] (9)
cyklohexylamin [CAS č. 108-91-8] (7)
mitomycin C [CAS č. 50-07-7] (6)
monomer akrylamidu [CAS 79-06-1] (10)
triethylenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami. Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné chromozomové aberace nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP

Počet zvířat

19. Velikost skupin při zahájení studie by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět samců na skupinu. Tento počet zvířat na skupinu se považuje za dostatečný k dosažení adekvátní statistické síly (tj. obvykle takové, aby bylo možno zjistit nejméně zdvojnásobení četnosti chromozomových aberací, když je úroveň negativní kontroly 1,0 % nebo více, s 80 % pravděpodobností na hladině spolehlivosti 0,05) (3) (11). Určitým vodítkem pro typické maximální požadavky na počet zvířat může být, že studie při dvou odběrech se třemi skupinami exponovanými dávce a s jednou souběžnou negativní kontrolní skupinou plus jednou pozitivní kontrolní skupinou (každá složena z pěti zvířat na skupinu) by vyžadovala 45 zvířat.

Plán expozice

20. Zkoušené chemické látky jsou zpravidla podávány jednorázově (tj. při jedné expozici); mohou být použity i jiné režimy dávkování za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

21. Ve skupině s nejvyšší dávkou by měly být po expozici provedeny dva odběry. Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené chemické látky (látek) a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální časový interval pro detekci chromozomových aberací, provede se jeden časný odběr a jeden pozdější odběr přibližně 24 hodin a 48 hodin po expozici. V případě jiné než nejvyšší dávky by měl být časný odběr proveden po 24 hodinách (v době kratší nebo rovnající se buněčnému cyklu spermatogonie B, což umožňuje optimalizovat pravděpodobnost hodnocení prvních metafází po expozici) po expozici, pokud není známa a odůvodněna jiná vhodnější doba.

22. Odběry mohou být provedeny také v jiné době. Například v případě chemických látek, které mohou způsobovat S-nezávislé účinky, mohou být vhodnější časnější odběry (tj. po méně než 24 hodinách).

23. Může být použit režim opakované aplikace dávky, například ve spojení se zkouškou jiné sledované vlastnosti, který používá podávání po dobu 28 dnů (např. zkušební metoda B.58); bylo by však potřeba použít další skupiny zvířat, aby vyhovovaly různým dobám odběru vzorků. Vhodnost takového plánu pak musí být vědecky odůvodněna případ od případu.

24. Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka chemické látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myší a potkanů je tato doba přibližně 3–5 h.

Dávkování

25. Provádí-li se předběžná studie ke stanovení rozsahu dávek, poněvadž ještě nejsou k dispozici vhodné údaje, které by mohly pomoci při stanovení dávek, měla by podle doporučení k provádění studií ke stanovení rozsahu dávek být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (12). Cílem této studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku (MTD), která je definována jako dávka vyvolávající slabé toxické účinky po dobu trvání zkoušky (například nenormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicita hematopoetického systému), nikoli však smrt nebo důkazy o bolesti, utrpení nebo strádání vyžadující utracení zvířat (13).

26. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající ve spermatogoniích některé známky toxicity (např. snížení počtu spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi). Toto snížení by nemělo překročit 50 %.

27. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.

28. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu (odstavec 18) a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (tj. varlata) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami. Studie, jejichž cílem je úplnější charakteristika kvantitativních informací o dávce a odezvě, mohou vyžadovat zařazení doplňkových skupin zvířat exponovaných dalším dávkám. Pro některé typy zkoušených chemických látek (např. humánních léčivých přípravků), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit. Pokud zkoušená chemická látka vyvolává toxicitu, měla by být zvolena limitní dávka plus dvě nižší dávky (jak je popsáno výše). Limitní dávka je 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní, nebo delší nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

Podávání dávek

29. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně. Intraperitoneální aplikace se většinou nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno, protože to obvykle není fyziologicky relevantní způsob expozice člověka. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a odběrem vzorku by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (viz odstavec 33). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podat žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti na všech úrovních dávek.

Pozorování

30. Všeobecné klinické pozorování pokusných zvířat a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie, nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Při studiích s alespoň týdenním trváním by se alespoň jednou týdně měla změřit spotřeba krmiva. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (13).

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů

31. Ihned po usmrcení se z jednoho nebo obou varlat získá suspenze zárodečných buněk, hypotonizuje se a fixuje podle stanovených protokolů (např. (2) (14) (15)). Poté se nanese na podložní sklíčka a obarví se (16) (17). Všechna sklíčka by měla být zakódována, aby hodnotitel neznal jejich identifikaci.

Analýza

32. U každého zvířete by mělo být posouzeno alespoň 200 buněk v dobře rozprostřené metafázi (3) (11). Jestliže je historická četnost negativních kontrol < 1 %, mělo by být posouzeno více než 200 buněk / zvíře, aby se zvýšila statistická síla (3). Používat by se měly takové metody barvení, které umožňují identifikaci centromery.

33. Chromozomové a chromatidové aberace by měly být zaznamenávány odděleně a klasifikovány podle podtypů (zlomy, výměny). Při stanovení, zda chemická látka indukuje významné navýšení výskytu buněk s chromozomovými aberacemi, se zaznamenají gapy, ale neberou se v úvahu. Postupy používané v laboratoři by měly zajistit, aby analýzu chromozomových aberací prováděli dobře odborně připravení hodnotitelé. Vzhledem k tomu, že při přípravě preparátů často dochází k poškození části buněk v metafázi s následnou ztrátou chromozomů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu nejméně $2n \pm 2$, kde n je haploidní počet chromozomů pro daný druh.

34. I když je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozomové aberace, je důležité zaznamenat četnost polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy, pokud jsou tyto jevy pozorovány (viz odstavec 44).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

35. Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk se strukturními chromozomovými aberacemi a počet chromozomových aberací na buňku. Chromatidové a chromozomové aberace klasifikované podle podtypů (zlomy, výměny) by měly být uvedeny odděleně spolu s jejich počty a četností v experimentálních a kontrolních skupinách. Gapy se zaznamenávají zvlášť. Četnost výskytu gapů se zaznamenává, ale do analýzy celkové četnosti strukturních chromozomových aberací se nezahrnuje. Zaznamená se procentuální podíl polyploidie a/nebo endoreduplikovaných chromozomů, pokud jsou pozorovány.

36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 30).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.

— Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole, které by obvykle měly být > 0 % a ≤ 1,5 % buněk s chromozomovými aberacemi, a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).

— Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které odpovídají publikovaným normám pro historické údaje o pozitivní kontrole a historickým pozitivním kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17, 18).

— Byl analyzován přiměřený počet buněk a dávek (viz odstavce 28 a 32).

— Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 25 a 26.

38. Je-li pozorována mitóza i meióza, měl by být jako míra cytotoxicity stanoven u všech exponovaných zvířat a zvířat sloužících jako negativní kontrola poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi, a to v celkovém vzorku 100 dělících se buněk na jedno zvíře. Pokud je sledována pouze mitóza, nejméně v 1 000 buňkách na zvíře by měl být stanoven mitotický index.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

— alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— nárůst je závislý na dávce alespoň při jednom odběru vzorků, a

— všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (11) (18). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

41. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

— žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a dále

— všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (11) (18). Negativní výsledek nevylučuje možnost, že chemická látka může indukovat chromozomální aberace v pozdějších fázích vývoje, které nejsou studovány, nebo genové mutace.

42. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

43. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní, a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (19).

44. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

45. Nárůst počtu polyploidních buněk může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozomové aberace (20). Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (21) (22), což je jiný mechanismus indukování numerických chromozomových změn než inhibice mitotických procesů (viz odstavec 2). Výskyt polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy by se proto měl zaznamenat odděleně.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

46. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), pokud se provádí.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění jeho použití,

— počet a věk zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění dob usmrcení,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

— skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby,

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— způsob utracení,

— způsob analgezie (pokud se používá),

— postupy izolace tkání,

— identifikace chemické látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka aplikace,

— metody přípravy preparátů,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení (pokud se používá více režimů expozice, tělesná hmotnost stanovená v průběhu režimu aplikace),

— známky toxicity,

— mitotický index,

— poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé metafázi meiózy nebo jiný průkaz expozice cílové tkáni,

— typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,

— celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— počet buněk s aberacemi ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

— podle možnosti závislost odezvy na dávce,

— použité statistické analýzy a metody,

— údaje o souběžné negativní kontrole,

— historické údaje o negativních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a 95 % interval spolehlivosti (je-li k dispozici), nebo publikované historické údaje o negativních kontrolách použité pro přijatelnost výsledků zkoušky,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole,

— změny ploidie, byly-li pozorovány, včetně četností polyploidie a/nebo endoreduplikovaných buněk.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

Dodatek

DEFINICE

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).

Centromera: oblast (oblasti) chromozomu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělicí vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Chemická látka: látka nebo směs.

Rozmanitost chromozomů: rozmanitost tvarů (např. metacentrické, akrocentrické atd.) a velikostí chromozomů.

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jedné chromatidy nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Klastogen: jakákoli chemická látka, která způsobuje strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním přerušením chromatid.

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

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

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

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

Numerická abnormalita: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitých zvířat.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (*n*) jiný než diploidní (tj. 3*n*, 4*n* atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, výměny.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.“

(5) V části B se kapitola B.40 nahrazuje tímto:

„B.40 **LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 430 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“) ([1])]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40 stanoví postup *in vitro*, který umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP.

2. Posuzování leptavých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40 byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40a (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4), jež rovněž dokážou v případě potřeby určit podkategorie žíravých chemických látek. Několik validovaných zkušebních metod *in vitro* bylo přijato jako zkušební metoda B.46 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro použití ke zkoušení dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících různé informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (6).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušební metody transkutánního elektrického odporu kůže potkana (TER), která využívá terčíky kůže k určení žíravých látek podle jejich schopnosti zapříčinit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA.

4. Aby mohly být vyhodnoceny zkoušky leptavých účinků na kůži *in vitro* pro účely regulace, byly provedeny předběžné validační studie (7) a poté formální validační studie zkušební metody TER s využitím kůže potkana pro posouzení leptavých účinků na kůži (8) (9) (10) (11). Výsledek těchto studií vedl k doporučení, že by zkušební metoda TER (určená jako validovaná referenční metoda – VRM) mohla být používána pro účely regulace pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* (12) (13) (14).

5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu TER *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (15). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu OECD ke zkoušení.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Validační studie (10) a další zveřejněné studie (16) (17) ukazují, že zkušební metoda TER dokáže rozlišit známé látky s leptavými účinky na kůži od látek, které na kůži nemají leptavé účinky, při celkové citlivosti 94 % (51/54) a specifičnosti 71 % (48/68) u databáze 122 látek.

([1]) 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.

8. Tato zkušební metoda řeší leptavé účinky na kůži *in vitro*. Umožňuje určení nežíravých a žíravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Jak prokazují validační studie (8) (9) (10) (11), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci žíravých látek a směsí do podkategorií podle systému GHS OSN / CLP. Platný právní rámec určí, jak bude tato zkušební metoda používána. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6).

9. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemikálií (především chemických látek) a empirická databáze validační studie obsahovala celkem 60 látek z nejrůznějších chemických tříd (8) (9). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Protože však pro některá skupenství nejsou okamžitě k dispozici zkušební položky s vhodnými referenčními údaji, je třeba poznamenat, že při validaci byl posuzován srovnatelně malý počet vosků a žíravých pevných látek. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost této zkušební metody ke zkoušení specifické kategorie látek, neměla by se tato zkušební metoda na tuto specifickou kategorii látek používat. Dále se předpokládá, že tato zkušební metoda je použitelná i pro směsi jako rozšíření její použitelnosti pro látky. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (*např.* podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012) (18), by se tato zkušební metoda neměla pro tuto konkrétní kategorii směsí používat. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9). Ačkoli není jejich zkoušení pomocí zkušební metody TER teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

PRINCIP ZKOUŠKY

10. Zkoušená chemická látka je aplikována až 24 hodin na epidermální stranu terčíků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčíky kůže oddělují obě komory. Terčíky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28–30 dní. Chemické látky s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (stratum corneum), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň (16) (viz odstavec 32). Jako hraniční hodnota TER pro pokožku potkanů byla vybrána hodnota 5 kΩ a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla buď značně nad (často > 10 kΩ), nebo značně pod (často < 3 kΩ) touto hraniční hodnotou (16). Všeobecně platí, že zkoušené chemické látky, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu. Použití jiných kožních přípravků nebo jiného přístroje může změnit volbu hraniční hodnoty a vyžadovat její další validaci.

11. Do zkušebního postupu je pro potvrzující zkoušku pozitivních výsledků včetně hodnot TER okolo 5 kΩ zařazen stupeň pro stanovení vázání barviva. Tento stupeň pro stanovení vázání barviva určuje, zda zvýšení permeability iontů je důsledkem fyzikálního porušení rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo se, že metoda TER s využitím kůže potkana umožňuje předvídat výsledky zjišťování leptavých účinků *in vivo* s králíky podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkušební metodu TER s využitím kůže potkana, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (16)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek [1]

Látka	č. CAS	Třída chemických látek [2]	Kategorie GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* [3]	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro*	Skupenství	pH [4]
Látky žíravé *in vivo*						
N,N'-dimethyl dipropylentriamin	10563-29-8	organická zásada	1A	6 × C	K	8,3
propan-1,2-diamin	78-90-0	organická zásada	1A	6 × C	K	8,3
kyselina sírová (10 %)	7664-93-9	anorganická kyselina	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	K	1,2
hydroxid draselný (10 % aq)	1310-58-3	anorganická zásada	(1A/)1B/1C	6 × C	K	13,2
kyselina oktanová (kaprylová)	124-07-2	organická kyselina	1B/1C	4 × C 2 × NC	K	3,6
2-terc-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	K	3,9
Látky nežíravé *in vivo*						
kyselina isostearová	2724-58-5	organická kyselina	NC	6 × NC	K	3,6
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	6 × NC	P	5,5
fenethylbromid	103-63-9	elektrofilní	NC	6 × NC	K	3,6
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofilní	NC	6 × NC	K	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutrální organická látka	NC	6 × NC	K	3,9
tetrachlorethen	127-18-4	neutrální organická látka	NC	6 × NC	K	4,5

Zkratky: aq = vodný; č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); VRM = validovaná referenční metoda; C = žíravý; NC = nežíravý.

(1) Látky pro zkoušení způsobilosti, roztříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií leptavých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validační studii ECVAM zkušební metody TER s využitím kůže potkana (8) (9). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního zdroje (8). Výběr zahrnoval pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii; iii) vyjadřují funkční charakteristiky validované referenční metody; iv) mají chemickou strukturu, která je dobře definována; v) vyvolávají v referenční zkušební metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

(2) Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

(3) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro kategorie GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C v tomto pořadí.

(4) Hodnoty pH převzaty z Fentem *et al.* (9) a Barratt *et al.* (8).

POSTUP

13. K dispozici jsou standardní prováděcí postupy pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana pro zjišťování leptavých účinků na kůži (19). Zkušební metody TER s využitím kůže potkana zahrnuté v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

Zvířata

14. Měli by být použiti potkani, protože citlivost jejich kůže k látkám v této zkušební metodě již byla prokázána (12) a jsou jediným zdrojem kůže, který je formálně validován (8) (9). Stáří (v době odběru kůže) a kmen potkanů jsou zvláště důležité pro zajištění toho, aby folikuly chlupů byly v latentní fázi, před začátkem růstu zralé srsti.

15. Hřbetní a boční srst mladých, přibližně 22denních samců nebo samic potkanů (z kmene příbuzného Wistaru nebo srovnatelného kmene) se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté umyjí opatrným otíráním, přičemž se oholená oblast ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů po druhém omytí, kdy jejich *stratum corneum* po odstranění srsti zregeneruje.

Příprava terčíků kůže

16. Zvířata se humánně usmrtí ve stáří 28–30 dní; toto stáří je zásadně důležité. Z každého zvířete se poté odstraní hřbetní a boční kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Odeberou se terčíky kůže o průměru přibližně 20 mm. Kůže může být před použitím terčíků uchovávána, je-li prokázáno, že pozitivní a negativní kontrolní údaje jsou ekvivalentní údajům získaným s kůží čerstvou.

17. Každý terčík kůže se přeloží přes jeden z konců teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté pečlivě utěsní ke konci teflonové trubičky vrstvou vazelíny. Trubička držená pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého $MgSO_4$ (154 mM) (obrázek 1). Terčík kůže musí být úplně ponořen do roztoku $MgSO_4$. Z jedné kůže potkana může být získáno 10 až 15 terčíků kůže. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 2.

18. Pro každou zvířecí kůži je před započetím zkoušky změřena hodnota TER dvou terčíků kůže jako postup kontroly jakosti. Pro oba terčíky by měla být naměřena hodnota elektrického odporu větší než 10 kΩ, mají-li být pro tuto zkušební metodu použity ostatní terčíky. Pokud je hodnota odporu nižší než 10 kΩ, musí být ostatní terčíky z dotyčné kůže ze zkoušek vyřazeny.

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

19. Pro každou zkoušku (experiment) by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. V každé zkoušce (experimentu) by měly být použity terčíky kůže z téhož zvířete. Navrženými zkoušenými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu je 10M kyselina chlorovodíková a pro negativní kontrolu destilovaná voda.

20. Kapalné zkoušené chemické látky (150 µl) se aplikují stejnoměrně na epidermis uvnitř trubičky. Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla rovnoměrně pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 µl) a trubička se lehce protřepe. K zajištění maximálního styku látky s kůží může být nutné zahřát pevnou látku až na 30 °C, aby se zkoušená chemická látka roztavila či změkla, nebo ji rozemlít na zrnitý materiál či prášek.

21. Pro každou zkoušenou a kontrolní chemickou látku se použijí tři terčíky kůže pro každou zkoušku (experiment). Zkoušené chemické látky se aplikují po dobu 24 hodin při 20–23 °C. Zkoušená chemická látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o nejvýše pokojové teplotě.

Měření TER

22. Impedance kůže se měří jako TER nízkonapěťovým impedančním Wheatstoneovým můstkem pro střídavý proud (18). Všeobecné specifikace můstku: provozní napětí 1 až 3 V, sinusový nebo pravoúhlý tvar kmitů střídavého proudu frekvence 50–1 000 Hz a rozsah měření nejméně 0,1–30 kΩ. Můstek použitý ve validační studii měří induktanci, kapacitanci a odpor až do hodnot 2 000 H, 2 000 μF, a 2 MΩ při frekvencích 100 Hz nebo 1 kHz za použití sériových nebo paralelních hodnot. Pro účely měření TER v rámci zkoušky leptavých účinků se zaznamenávají hodnoty odporu při frekvenci 100 Hz a za použití sériových hodnot. Před měřením elektrického odporu se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70 % ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol z trubice vylije a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku $MgSO_4$ (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v kΩ/terčík kůže (obrázek 1). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 2. Svorka vnitřní elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku $MgSO_4$ nemění. Vnější elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi pružinovou svorkou a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 2), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu. Proto by vzdálenost mezi vnitřní elektrodou a terčíkem kůže měla být konstantní a minimální (1–2 mm).

23. Je-li naměřená hodnota vyšší než 20 kΩ, může to být způsobeno zbytky vrstvy zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a přibližně 10 sekund se protřepává; roztok $MgSO_4$ se odstraní a měření se opakuje s čerstvým $MgSO_4$.

24. Vlastnosti a rozměry zkušebního přístroje a použitý experimentální postup mohou ovlivnit naměřené hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ pro leptavé účinky byla odvozena na základě údajů zjištěných se specifickým přístrojem a postupem popsanými v této zkušební metodě. Pokud se změní podmínky zkoušky nebo je použit jiný přístroj, mohou platit jiné prahové a kontrolní hodnoty. Proto je nutné kalibrovat metodu a prahové hodnoty odporu zkoušením řady vhodných látek vybraných z látek použitých ve validační studii (8) (9) nebo z tříd chemických látek podobných zkoušeným látkám. Soubor vhodných látek je uveden v tabulce 1.

Metody stanovení vázání barviva

25. Expozice kůže některým nežíravým materiálům může snížit odpor pod hraniční hodnotu 5 kΩ, v důsledku čehož je umožněn průnik iontů přes *stratum corneum* a snižuje se elektrický odpor (9). Např. neutrální organické látky a povrchově aktivní látky (včetně detergentů, emulgátorů a jiných povrchově aktivních látek) mohou vést k odstranění kožních lipidů, čímž se bariéra stane pro ionty průchodnější. Proto pokud jsou při absenci viditelného poškození terčíků kůže hodnoty TER vyvolané těmito chemickými látkami okolo 5 kΩ, nebo jsou nižší než 5 kΩ, mělo by být na kontrolních a upravených tkáních provedeno posouzení průniku barviva ke zjištění, zda jsou naměřené hodnoty TER výsledkem zvýšené permeability kůže, nebo poleptání kůže (7) (9). V případě poleptání kůže, kdy *stratum corneum* je porušeno, barvivo sulforhodamin B při aplikaci na kůži rychle proniká a zbarvuje podložní tkáň. Toto konkrétní barvivo je stabilní v prostředí širokého rozsahu látek a nemá na něj vliv níže popsaný extrakční postup.

Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B

26. Po měření TER se roztok síranu hořečnatého vylije z trubičky a kůže se pečlivě přezkoumá, zda není zjevně poškozena. Pokud není patrné žádné zjevné větší poškození (např. perforace), aplikuje se na epidermální stranu každého terčíku kůže po dobu 2 hodin 150 μl 10 % roztoku (m/V) barviva sulforhodaminu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. CAS 3520-42-1) v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 sekund omývají tekoucí vodou o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou

z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20 ml skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 minut protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje a pak se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30 % roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C.

27. Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 minut při 21 °C (při relativní odstředivé síle ~175 × g). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30 % (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (A) roztoku se měří přibližně při 565 nm.

Výpočet obsahu barviva

28. Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot absorbance A (9) (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže využitím vhodné kalibrační křivky a poté se vypočte jeho střední hodnota.

Kritéria přijatelnosti

29. Střední hodnoty výsledků TER jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozmezí dané metody v dotyčné zkušební laboratoři. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou přijatelné hodnoty rozmezí odporu uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí odporu (kΩ)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	0,5–1,0
Negativní	destilovaná voda	10–25

30. Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Doporučené přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva pro kontrolní látky pro popsanou metodiku a přístroje jsou uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (μg/terčík kůže)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	40–100
Negativní	destilovaná voda	15–35

Interpretace výsledků

31. Hraniční hodnota TER odlišující žíravé zkoušené chemické látky od nežíravých byla stanovena během optimalizace zkušební metody, testována během předvalidační fáze a potvrzena ve formální validační studii.

32. Predikční model pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana (9) (19), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden níže:

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která nemá na kůži leptavé účinky (nežíravá látka):

i) je-li střední hodnota TER změřená pro tuto zkoušenou chemickou látku větší než 5 kΩ; nebo

ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a

— terčíky kůže nevykazují žádné zjevné poškození (např. perforaci), a

— střední obsah barviva v terčíku kůže je nižší než (<) střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která má na kůži leptavé účinky (žíravá látka):

i) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a terčíky kůže jsou zjevně poškozeny (např. perforovány); nebo

ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a

— terčíky kůže nejsou zjevně poškozeny (např. perforovány), ale

— střední obsah barviva v terčíku kůže je větší nebo roven (≥) střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).

33. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky (experiment) za použití alespoň tří replikátů terčíků kůže. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo střední hodnota TER rovnající se 5 ± 0,5 k, by se mělo zvážit provedení druhé nezávislé zkoušky (experimentu), jakož i třetí zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedenými zkouškami (experimenty).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

34. Hodnoty odporu (kΩ) a případně hodnoty obsahu barviva (μg/terčík) pro zkoušenou chemickou látku a také pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky, včetně údajů za jednotlivé replikované terčíky z jednotlivých zkoušek (experimentů) a jejich střední hodnoty spolu s jejich ± směrodatnou odchylkou. Uvádějí se všechny opakované experimenty. Pozorované poškození terčíků kůže je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

35. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušených látek chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Pokusná zvířata:

— použitý kmen a pohlaví,

— stáří zvířat použitých jako dárcovská zvířata,

— zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,

— podrobnosti přípravy kůže.

Zkušební podmínky:

— kalibrační křivky zkušebního přístroje,

— kalibrační křivky pro zkoušku účinnosti vázání barviva, pásmová propustnost použitá pro měření hodnot optické hustoty, případně rozsah linearity přístroje měřícího optické hustoty (např. spektrofotometru),

— podrobnosti zkušebního postupu pro měření TER,

— případně podrobnosti zkušebního postupu pro stanovení vázání barviva,

— použité zkušební dávky, doba (doby) expozice a teplota (teploty) expozice,

— informace o použitém postupu vymývání po expozici,

— počet replik terčíků kůže použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní a negativní kontrola),

— popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,

— odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zejména zahrnovat:

i) přijatelnost hodnot TER pozitivních a negativních kontrol (v kΩ) s odkazem na rozsahy odporu pozitivních a negativních kontrol;

ii) přijatelnost hodnot obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol (v µg/terčík) s odkazem na rozpětí obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol;

iii) přijatelnost výsledků zkoušek s odkazem na historickou variabilitu mezi replikami terčíků kůže,

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu.

Výsledky:

— údaje změřených hodnot TER a případně obsahu vázaného barviva pro jednotlivé zkoušené chemické látky a kontroly, pro každé provedení zkoušky (experiment) a každou repliku terčíků kůže (jednotlivá zvířata a jednotlivé vzorky kůže), střední hodnoty, směrodatné odchylky a variační koeficienty zpracované ve formě tabulky,

— popis jakýchkoli pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na webových stránkách: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40a této přílohy, Kožní model *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

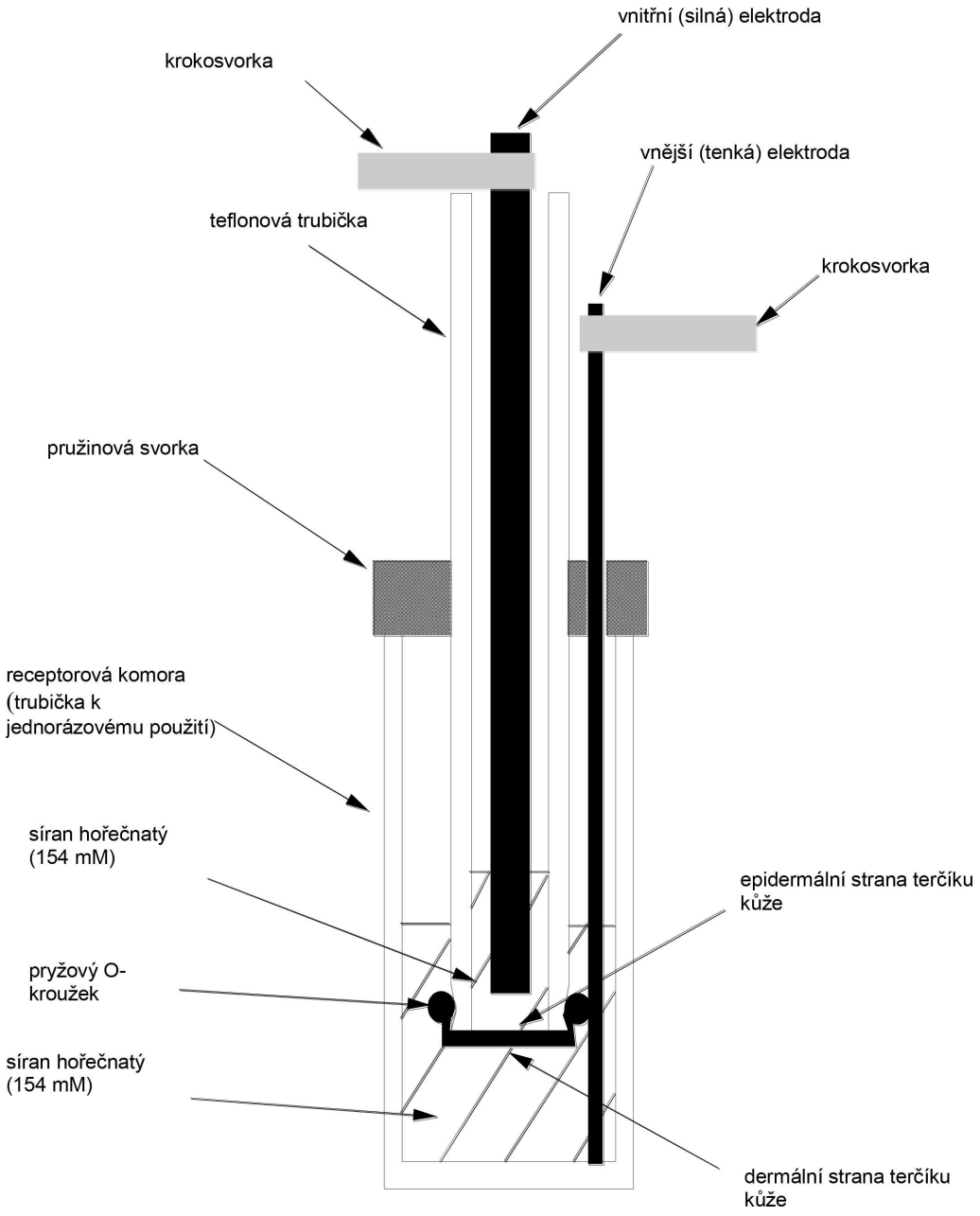
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol*. 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

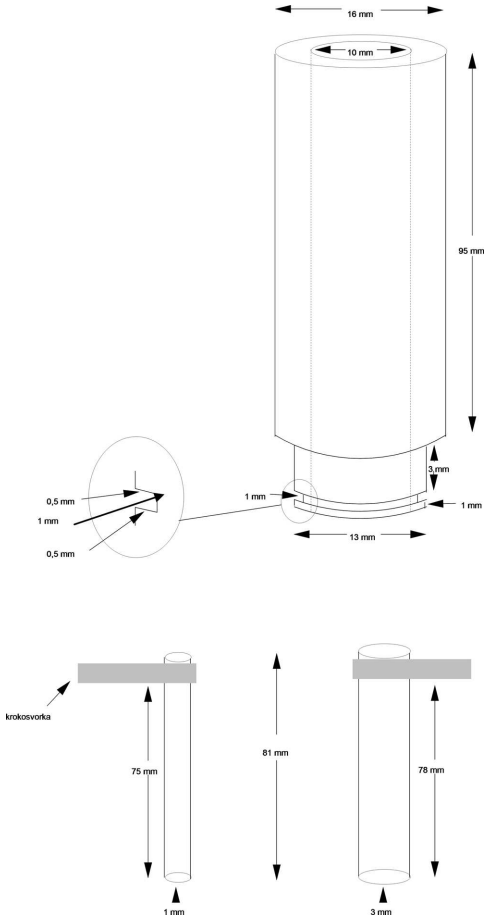
Obrázek 1

Přístroj Pro Zkoušku Ter Na Kůži Potkana



Obrázek 2

Rozměry Teflonové a Receptorové Trubičky a Použitých Elektrod



Kritické faktory přístroje uvedeného výše:

— vnitřní průměr teflonové trubičky,

— taková délka elektrod vzhledem k teflonové trubičce a receptorové trubičce, aby se elektrody nedotýkaly terčíku kůže a aby standardní délka elektrody byla ve styku s roztokem $MgSO_4$,

— objem roztoku $MgSO_4$ v receptorové trubičce musí vzhledem k hladině v teflonové trubičce dávat takovou výšku kapaliny, jak je znázorněno na obrázku 1,

— terčík kůže musí být k teflonové trubičce připevněn tak, aby elektrický odpor představoval skutečnou míru vlastností kůže.

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (20).

C(„corrosive:"): žíravá látka.

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost" a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (20).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (OSN)): systém navrhující klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive"): nežíravá látka.

OD („optical density"): optická hustota (absorbance).

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

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 spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek.

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 zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (20).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (20).

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Leptavé účinky na kůži:*in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

(Provedení) zkoušky: jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně třech replikách terčíků kůže.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.“

(6) V části B se kapitola B.40a nahrazuje tímto:

„B.40a **LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS (RhE)**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 431 (2016). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“) ([1])]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40a stanovuje postup *in vitro*, který umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Umožňuje také částečnou klasifikaci žíravých látek do podkategorií.

2. Posuzování potenciálu leptavých účinků chemických látek na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404; původně vydané v roce 1981 a revidované v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40a byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 430) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4). Dále byla přijata zkušební metoda B.46 *in vitro* (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro zkoušení potenciálu dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (6).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Využívá rekonstruované lidské *epidermis* (RhE) (získané z netransformovaných keratinocytů lidské epidermis), která věrně napodobuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební metody používající model s rekonstruovanou lidskou epidermis a možnost používat metody na podporu klasifikace žíravých chemických látek do podkategorií, dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu k měření životaschopnosti.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje čtyři validované komerčně dostupné modely RhE. Pro dva z těchto komerčně dostupných zkušebních modelů, EpiSkin™ Standard Model (SM) a EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200), byly provedeny (11) (12) předvalidační studie (7) (v dalším textu jen validované referenční metody - VRM) s následnou formální validační studií pro posouzení leptavých účinků na kůži (8)(9)(10). Závěr z těchto studií vedl k doporučení, že pro rozlišení žíravých (C) a nežíravých látek (NC) pro regulační účely by mohly být použity tyto dvě validované referenční metody a že model EpiSkin™ by navíc mohl být používán na podporu třídění žíravých látek do podkategorií (13)(14)(15). Dva další komerčně dostupné modely *in vitro* pro zkoušení leptavých účinků na kůži za použití rekonstruované lidské epidermis vykazují podle validace na základě standardů funkčnosti podobné výsledky jako EpiDerm™ VRM (16) (17) (18). Jedná se o metody SkinEthic™ RHE ([2]) a epiCS® (dřívější název EST1000), které mohou být také použity pro regulační účely pro rozlišení žíravých a nežíravých látek (19) (20). Validační studie provedené výrobci modelu RhE v letech 2012 až 2014 s vylepšeným protokolem korigujícím interference nespecifické redukce MTT zkoušenými chemickými látkami zlepšily funkční způsobilost pro rozlišení C/NC i podpůrnou klasifikaci žíravých látek do podkategorií (21) (22). Byly provedeny další statistické analýzy povalidačních údajů generovaných modely EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a EpiCS® s cílem nalézt alternativní predikční modely, které by zlepšily prediktivní schopnost klasifikace do podkategorií (23).

([1]) 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 353/1, 31.12.2008, s. 1.

([2]) Zkratka RhE („reconstructed human epidermis“ = rekonstruovaná lidská epidermis) se používá pro všechny modely na bázi technologie RhE. Zkratka RHE použitá ve spojení s modelem SkinEthic™ znamená totéž, ale jako součást obchodního názvu této konkrétní zkušební metody se všechna písmena píšou velká.

5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu RhE *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (24) stanovenými v souladu se zásadami uvedenými v pokynu OECD č. 34 (25). Vzájemné uznávání údajů bude zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu ke zkoušení. Zkušební modely zahrnuté do tohoto pokynu ke zkoušení mohou být použity pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušební metody pro leptavé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Tato zkušební metoda umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Dále tato zkušební metoda podporuje klasifikaci žíravých látek a směsí do podkategorií, a to na doplňkovou podkategorii 1A podle GHS OSN (1), jakož i kombinaci podkategorií 1B a 1C (21)(22)(23). Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišení mezi leptavými účinky na kůži podkategorie 1B a podkategorie 1C podle systému GHS OSN a nařízení CLP vzhledem k omezenému množství dobře známých žíravých chemických látek *in vivo* podkategorie 1C. Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS® dokážou rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC).

8. Při validaci zkušebních modelů, které jsou zahrnuty v této zkušební metodě a používají se pro určení nežíravých a žíravých látek, byla testována široká škála chemických látek představujících zejména jednotlivé látky; empirická databáze validační studie obsahovala 60 chemických látek z nejrůznějších chemických tříd (8) (9) (10). Vývojáři zkušební metody provedli zkoušení za účelem prokázání citlivosti, specifičnosti, přesnosti a vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti analýzy pro klasifikaci do podkategorií a výsledky kontrolovala OECD (21) (22) (23). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další úprava vzorku není vyžadována. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost modelů zařazených do této zkušební metody pro specifickou kategorii zkoušených chemických látek, neměly by se pro tuto specifickou kategorii zkoušených chemických látek používat. Dále se předpokládá, že je tato zkušební metoda jako doplnění použitelnosti pro látky použitelná pro směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v (26)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9) (10). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

9. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitém pro měření formazanu MTT (viz odstavce 25-31).

10. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* a je založena na tomtéž zkušebním systému RhE, i když podle jiného protokolu (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6). Tento integrovaný přístup ke zkouškám a posuzování zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži (jak je uvedeno v této zkušební metodě) a dráždivých účinků na kůži *in vitro* před zvažováním zkoušek na živých zvířatech. Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.
12. Zkušební metoda RhE je založena na předpokladu, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difuzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách. Životaschopnost buněk se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, tetrazolium-bromid; číslo CAS 298–93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (27). Žíravé chemické látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (viz odstavce 35 a 36). Ukázalo se, že zkušební metoda leptavých účinků na kůži na bázi RhE umožňuje předvídat leptavé účinky na kůži *in vivo* u králíků podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

13. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE, který dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V případě použití metody pro podrobnou klasifikaci je třeba prokázat také správné zařazení do podkategorií. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (24)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek [1]

Látka	č. CAS	Třída chemických látek [2]	Kat. GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* [3]	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro* [4]	MTT redukční činidlo [5]	Skupenství látky
Podkategorie 1A Žíravé látky *in vivo*						
Bromoctová kyselina	79-08-3	organická kyselina	1A	(3) 1A	—	P
Dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganická kyselina	1A	(3) 1A	—	K
Fenol	108-95-2 Org.	Fenol	1A	(3) 1A	—	P
Dichloroacetyl chlorid	79-36-7 Org.	elektrofil	1A	(3) 1A	—	K
Kombinace podkategorií 1B a 1C Žíravé látky *in vivo*						
Monohydrát kyseliny glyoxylové	563-96-2	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	P

Látka	č. CAS	Třída chemických látek ([2])	Kat. GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* ([3])	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro* ([4])	MTT redukční činidlo ([5])	Skupenství látky
Podkategorie 1A Žíravé látky *in vivo*						
Kyselina mléčná	598-82-3	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	K
Ethanolamin	141-43-5	organická zásada	1B	(3) 1B a 1C	A	viskózní
Kyselina chlorovodíková (14,4 %)	7647-01-0	anorganická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	K
Nežíravé látky *in vivo*						
Fenethylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	(3) NC	A	K
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	(3) NC	—	P
4-(methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	(3) NC	A	K
Kyselina laurová	143-07-7	organická kyselina	NC	(3) NC	—	P

Zkratky: č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS) VRM = validovaná referenční metoda NC = nežíravý; A = ano; P = pevné; K = kapalné.

([1]) Látky pro zkoušení způsobilosti, roztříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií žíravých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validačních studiích ECVAM modelů EpiSkin™ a EpiDerm™ (8) (9) (10) a z povalidačních studií vycházejících z údajů poskytnutých vývojáři modelů EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® (23). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního zdroje (8) (10). Výběr zahrnuje pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validované referenční metody dokážou změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validačních studiích; iii) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány; iv) vyvolávají v referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky; v) vyvolávají v referenční zkušební metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

([2]) Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

([3]) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro GHS OSN/CLP 1A, 1B, respektive 1C.

([4]) Predikce pro validované referenční metody *in vitro* uvedené v této tabulce byly získány se zkušebními modely EpiSkin™ a EpiDerm™ (VRM) během povalidačního zkoušení provedeného vývojáři zkušebních metod.

([5]) Hodnoty životaschopnosti získané ve validačních studiích leptavých účinků na kůži ECVAM nebyly korigovány podle přímé redukce MTT (ve validačních studiích nebyly provedeny kontroly s utracenými zvířaty). Povalidační údaje generované vývojáři zkušebních metod, které jsou uvedeny v této tabulce, však byly získány s upravenými kontrolami (23).

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 zkušební metoda úspěšně zavedena a je prokázána způsobilost tuto metodu správně používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

POSTUP

15. Následuje obecný popis složek a postupů zkušebních modelů s použitím rekonstruované lidské epidermis při hodnocení leptavých účinků na kůži, kterých se týká tato zkušební metoda. Modely RhE schválené jako vědecky validní pro použití v rámci této zkušební metody, tj. modely EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE a epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), lze získat z komerčních zdrojů. K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro tyto čtyři modely RhE (34)(35)(36)(37), hlavní složky zkušebních metod jsou shrnuty v dodatku 2. Při provádění a používání jednoho z těchto modelů v laboratoři se doporučuje použít příslušný standardní pracovní postup. Zkoušení pomocí čtyř zkušebních modelů RhE zahrnutých v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Všeobecné podmínky

16. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční svrchní vrstvou epidermis nazývanou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci (viz odstavec 18). 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 tkání se používá zkouška MTT (27). Vitální buňky tkáňového modelu redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (38). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly je zapotřebí zjistit u subjektu, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti hodnot OD negativní kontroly pro čtyři validované zkušební modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty OD) po dobu trvání expozice.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro kontrolu kvality šarže

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Bariérová funkce

18. *Stratum corneum* a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku určitých cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použitého modelu RhE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Morfologie

19. Je třeba provést histologické vyšetření modelu RhE prokazující vícevrstevnou strukturu podobnou lidské epidermis, která obsahuje *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* a *stratum corneum* a má lipidový profil podobný lipidovému profilu lidské epidermis. Histologické vyšetření každé šarže použitého modelu RhE prokazující vhodnou morfologii tkání by měl poskytnout vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Reprodukovatelnost

20. Uživatelé zkušebních metod by měli prokázat jejich reprodukovatelnost v čase s pozitivními a negativními kontrolami. Kromě toho by zkušební metoda měla být používána pouze v případě, že vývojář/dodavatel modelu RhE poskytne údaje prokazující reprodukovatelnost v čase s žíravými a nežíravými chemickými látkami například ze seznamu vhodných látek (tabulka 1). V případě použití zkušební metody pro podrobnou kategorizaci je třeba prokázat také reprodukovatelnost s ohledem na zařazení do podkategorií.

Kontrola kvality

21. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE 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 se poskytnou uživatelům metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky jako látky s leptavými účinky mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití tkáňových šarží, které prošly kontrolou kvality. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC50 nebo ET50 stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované zkušební modely.

Tabulka 3

Kritéria kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(34)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(35)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 10,0 hodin
epiCS® (1 % Triton X-100)(36)	ET50 = 2,0 hodiny	ET50 = 7,0 hodin

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

22. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly pro jednotlivé expozice by se měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. V případě kapalných a pevných chemických látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. že je třeba použít nejméně 70 µl/cm^2 nebo 30 mg/cm^2. V závislosti na modelech je nutno povrch epidermis před nanesením pevných chemických látek zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem epidermis (34) (35) (36) (37). Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Aplikační metoda by měla být pro zkoušenou chemickou látku vhodná (viz např. odkazy (34–37). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout

z *epidermis* vodným pufrem nebo 0,9 % roztokem NaCl. Podle toho, který ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE se používá, použijí se dvě nebo tři doby expozice na jednu zkoušenou chemickou látku (pro všechny čtyři platné modely RhE: 3 min. a 1 hodina; pro model EpiSkin™ čtyři další hodiny expozice). V závislosti na použitém zkušebním modelu RhE a posuzované době expozice se může inkubační teplota v průběhu expozice pohybovat v rozsahu od pokojové teploty do 37 °C.

23. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí dosavadních hodnot přijatelnosti. Navrženými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu jsou ledová kyselina octová nebo 8N KOH v závislosti na použitém modelu RhE. Je třeba poznamenat, že 8N KOH přímo redukuje MTT, což může vyžadovat upravené kontroly, jak je popsáno v odstavcích 25 a 26. Navrženými látkami pro negativní kontrolu jsou 0,9 % (m/V) roztok NaCl nebo voda.

Měření životaschopnosti buněk

24. K měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody by se měla používat zkouška MTT, což je kvantitativní zkouška (27). Vzorek tkáně se na dobu tří hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (0,3 nebo 1 mg/ml). Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 30 a 31) (38).

25. Zkoušené chemické látky mohou interferovat se zkouškou MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan (570 ± 30 nm, zejména modré a fialové chemické látky). Měly by se používat i další kontroly za účelem zjištění a korigování případné interference těchto zkoušených chemických látek, jako je kontrola na nespecifickou redukci MTT (NSMTT) a kontrola na nespecifické zbarvení (NSC) (viz odstavce 26 až 30). To je zvláště důležité v případě, že se určitá zkoušená chemická látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*, takže je přítomna v tkáních, když se provádí zkouška životaschopnosti MTT. Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, lze nalézt ve standardních prováděcích postupech zkušebních modelů (34) (35) (36) (37).

26. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného média MTT (34) (35) (36) (37). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné epidermis nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku v podobném množství jako životaschopné tkáně. Každá chemická látka redukující MTT se aplikuje na nejméně dva neživé tkáňové replikáty na každou dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce leptavých účinku na kůži. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).

27. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 30 a 31). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická

látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce na leptavé účinky pro kůži, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně na každou dobu expozice s každou zbarvenou zkoušenou chemickou látkou (při každém provedení zkoušky). Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).

28. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 26) a působí barevné interference (viz odstavec 27), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících s analýzou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 26. Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).

29. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearity svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru nebo když již byla zkoušená chemická látka definována jako látka s leptavými účinky podle zjištěné nekorigované procentuální životaschopnosti (viz odstavce 35 a 36), je vhodné zejména standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} > 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně.

30. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní HPLC/UPLC spektrofotometrický postup měření formazanu MTT (viz odstavec 31) (37). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (38). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 26). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné

negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

31. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (38). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (38) (39). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

32. U každé zkušební metody s použitím platných modelů rekonstruované lidské epidermis by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, jak je popsáno v tabulce 2, a neměly by být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. ledovou kyselinou octovou nebo 8N KOH, by měly odrážet schopnost tkání reagovat na žíravou chemickou látku v podmínkách zkušebního modelu (viz dodatek 2). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušené chemické látky a/nebo kontrolních chemických látek by měla spadat do přijatelných limitů pro každý požadavek platného modelu RhE (viz dodatek 2) (např. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by neměl přesahovat 30 %). Jestliže se negativní nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky nachází mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za nezpůsobilé a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže se variabilita zkoušených chemických látek pohybuje mimo definovaný rozsah, je třeba jejich zkoušení opakovat.

Interpretace výsledků a predikční model

33. Hodnoty absorbance OD dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být použity k výpočtu životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole, která je stanovena na úroveň 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Hraniční procentuální hodnoty životaschopnosti buněk, kterými se rozlišují žíravé zkoušené chemické látky od nežíravých (nebo kterými se rozlišují různé podkategorie leptavých účinků), jsou definovány níže v odstavcích 35 a 36 pro jednotlivé modely zahrnuté do této zkušební metody a měly by se používat pro interpretaci výsledků.

34. U zkoušené chemické látky s jednoznačnou výslednou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření, lze zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

35. Predikční model pro zkušební model EpiSkin™ pro leptavé účinků na kůži (9) (34) (22), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden v tabulce 4:

Tabulka 4

Predikční model EpiSkin™

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t=3, 60 a 240 minut)	Zvážit predikci
< 35 % po 3 minutách expozice	**Žíravá:** •Doplňková podkategorie 1A (*)
≥ 35 % po 3 minutách expozice **A** < 35 % po 60 minutách expozice **NEBO** ≥ 35 % po 60 minutách expozice **A** < 35 % po 240 minutách expozice	**Žíravá:** •Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
≥ 35 % po 240 minutách expozice	**Nežíravá**

(*) Údaje vypracované za účelem posouzení užitečnosti zkušebních modelů RhE na podporu klasifikace do podkategorií ukázaly, že zhruba 22 % výsledků z podkategorie 1A u zkušebního modelu EpiSkin™ může ve skutečnosti představovat látky/směsi podkategorie 1B nebo podkategorie 1C (tj. nadhodnocené klasifikace) (viz dodatek 3).

36. Predikční modely pro zkušební modely leptavých účinků na kůži EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) a epiCS® (16) (23) (37), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, jsou uvedeny v tabulce 5:

Tabulka 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t = 3 a 60 minut)	Zvážit predikci
KROK 1 pro EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®	
< 50 % po 3 minutách expozice	**Žíravá**
≥ 50 % po 3 minutách expozice **A** < 15 % po 60 minutách expozice	**Žíravá**
≥ 50 % po 3 minutách expozice **A** ≥ 15 % po 60 minutách expozice	**Nežíravá**
KROK 2 pro EpiDerm™ SCT - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 25 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t = 3 a 60 minut)	Zvážit predikci
KROK 1 pro EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®	
≥ 25 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro SkinEthic™ RHE - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 18 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 18 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro epiCS® - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 15 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 15 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. Za každou zkoušku by se údaje získané z jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítaná životaschopnost buněk v procentech pro každou zkoušenou chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Dále by měly být uvedeny střední hodnoty a rozsahy životaschopnosti a variační koeficienty mezi tkáňovými replikáty pro každou zkoušku. Pozorované interakce s činidlem MTT a látkami, které MTT přímo redukují, nebo barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol a jeho (případné) zdůvodnění

Zkušební podmínky:

— použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),

— kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení,

— popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC,

— 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 prediktivní schopnost;

v) kontroly kvality modelu;

— odkaz na historické údaje modelu. Ten by měl zejména zahrnovat přijatelnost údajů QC s odkazem na historické údaje šarže,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

— podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici),

— dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,

— délka doby (dob) expozice a teploty (teplot) expozice,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}) na každou dobu expozice,

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

— střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

— tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každou dobu expozice, každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně, rozdílů mezi replikáty, případně běžných odchylek a variačních koeficientů,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdílů mezi tkáňovými replikáty, (případně) běžných odchylek a variačních koeficientů a konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,

— výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních chemických látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti každého provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Dostupné na internetových stránkách: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost:: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (25).

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

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost" a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (25).

ET_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC_{50}.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhující klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET_{50}.

Nekonečná dávka: množství zkoušené látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci > 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“):: nežíravá látka.

Kontrola NSC_{killed}: nespecifická barevná kontrola u neživých tkání.

Kontrola NSC_{living}:: nespecifická barevná kontrola u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

OD: optická hustota.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební 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 zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (25).

Relevantnost: popis vztahu zkušební metody k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkušební metoda smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (25).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (25).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKUŠEBNÍCH MODELŮ RHE VALIDOVANÝCH PRO ZKOUŠENÍ LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Povrch modelu	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Počet tkáňových replikátů	Nejméně 2 na každou dobu expozice	2–3 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice
Experimentální dávky a aplikace	Kapaliny a viskózní látky: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Pevné látky: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl roztoku NaCl (9 g/l) Vosky/lepivé látky: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s nylonovou síťkou	Kapaliny: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s nylonovou síťkou nebo bez ní *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Polotuhé látky: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Pevné látky: 25 µl H_2O (nebo více v případě potřeby) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vosky: ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H_2O.	Kapaliny a viskózní látky: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) s použitím nylonové síťky *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Pevné látky: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vosky/lepivé látky: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) s použitím nylonové síťky	Kapaliny: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s použitím nylonové síťky *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Polotuhé látky: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Pevné látky: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (nebo více v případě potřeby) Vosky: ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H_2O.

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka)+ 2 ml MTT roztoku 0,3 mg/ml po dobu 180 ± 5 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené vodou	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	10 µl (kapalina) nebo 10 mg (pevná látka) + 90 µl H_2O mícháno po dobu 15 min při pokojové teplotě → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O mícháno po dobu 60 min při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni
Doba expozice a teplota	3 min, 60 min (± 5 min) a 240 min (± 10 min) Ve ventilované skříni Pokojová teplota (RT, 18–28°C)	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Oplachování	25 ml 1 x PBS (2 ml/na ponoření)	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negativní kontrola	50 µl roztoku NaCl (9 g/l) Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice
Pozitivní kontrola	50 µl ledové kyseliny octové Zkoušeno pouze po dobu 4 hodin	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl 8N KOH Zkoušeno pouze po dobu 1 hodiny	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice
Roztok MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Extrakční rozpouštědlo	500 µl acidifikovaného isopropylalkoholu (0,04 N HCl v isopropylalkoholu) (izolovaná tkáň plně ponořená)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	Přes noc při pokojové teplotě, chráněno před světlem	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Odečet OD	570 nm (545–595 nm) bez referenčního filtru	570 nm (nebo 540 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	540–570 nm bez referenčního filtru
Kontrola kvality tkání	18 hodin expozice za použití SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 4,08 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 8,7 hodiny	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 4,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 10,0 hodin	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 2,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 7,0 hodin
Kritéria přijatelnosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (NaCl) by měla být ≥ 0,6 a ≤ 1,5 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (ledová kyselina octová) po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti by variační koeficient (CV) mezi tkáňovými replikáty měl být ≤ 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 3,0 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny (a případně 4 hodin), vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %

Dodatek 3

FUNKČNÍ ZPŮSOBILOST ZKUŠEBNÍCH MODELŮ PRO KLASIFIKACI DO PODKATEGORIÍ

V následující tabulce je uvedena funkční způsobilost čtyř zkušebních modelů vypočtená ze skupiny 80 chemických látek zkoušených čtyřmi dodavateli, kteří zkoušky vyvinuli. Výpočty provedl sekretariát OECD a zkontrolovala a schválila je podskupina odborníků (21) (23).

Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™ , SkinEthic™ a epiCS® lze rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC)

Funkční způsobilost, podíly nadhodnocené klasifikace do podkategorií, podíly podhodnocené klasifikace do podkategorií a přesnost (prediktivní schopnost) čtyř zkušebních modelů podle skupiny 80 chemických látek, z nichž všechny byly zkoušeny každým zkušebním modelem ve 2 nebo 3 zkouškách:

STATISTIKA PREDIKCÍ ZÍSKANÝCH Z CELÉ SKUPINY CHEMICKÝCH LÁTEK

(n = 80 chemických látek zkoušených ve 2 nezávislých zkouškách u modelu epiCS® nebo ve 3 nezávislých zkouškách u modelů EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ a SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*), respektive 240 klasifikací)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Nadhodnocená klasifikace do podkategorií:				
1B a 1C nadhodnoceně klasifikované jako 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorií 1B a 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorie 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
nadhodnoceně klasifikovaná žíravost	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Celkový podíl nadhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Podhodnoceně klasifikované do podkategorií:				
1A podhodnoceně klasifikované do podkategorií 1B a 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A nadhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B a 1C podhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Celkový podíl podhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Správné klasifikace:				
1A správně klasifikována	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B a 1C správně klasifikovány	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
negativní kontrola správně klasifikována	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Celková přesnost	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

Negativní kontrola: Nežíravá

(*) jedna chemická látka byla zkoušena jednou v modelu epiCS® z důvodu nedostupnosti (23)

Dodatek 4

Klíčové Parametry A Kritéria Přijatelnosti Pro Způsobilost Spektrofotometrického Systému Hplc/Uplc Pro Měření Formazanu Mtt Extrahovaného z Rekonstruované Lidské Epidermis

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (37)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$ (1)
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n=5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤vlivy matrice ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu $ULOQ^2$ (2)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml), Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, je-li požadována	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, −20 °C, −80 °C)	%Dev ≤ 15 %“

(1) LLOQ: dolní mez stanovitelnosti, definovaná, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: horní mez stanovitelnosti, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 µg/ml. [[G1]]

(7) V části B se kapitola B.46 nahrazuje tímto:

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

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 439 (2015). Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky v délce až 4 hodin [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN] (1) a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. (dále jen „nařízení CLP“) ([1]). Tato zkušební metoda stanoví postup *in vitro*, který lze použít k určení nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látek a směsí) patřících v rámci systému GHS OSN a nařízení CLP do kategorie 2 (2). V oblastech, které nepřijaly volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN (slabě dráždivé látky), se může tato zkušební metoda rovněž používat k identifikaci neklasifikovaných látek. Proto může být v závislosti na regulačním rámci a používaném systému klasifikace tato zkušební metoda užívaná k určení dráždivých účinků chemických látek na kůži jako samostatná zkouška nahrazující zkoušky dráždění kůže *in vivo*, nebo jako částečná náhradní zkouška v rámci strategie zkoušení (3).

2. Hodnocení dráždivých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat [zkušební metoda B.4, rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015] (4). Pro zkoušení leptavých účinků byly přijaty tři validované zkušební metody *in vitro* jako zkušební metoda EU B.40 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 430), zkušební metoda OECD B.40a (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) a zkušební metoda B.65 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (5) (6) (7). Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (3).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušebního systému *in vitro* s využitím rekonstruované lidské *epidermis* (RhE), která věrně napodobuje biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Zkušební systém používá jako zdroje buněk netransformované keratinocyty získané z lidské epidermis na rekonstrukci epidermálního modelu s reprezentativní histologií a cytoarchitekturou. K dispozici jsou také standardy funkčnosti usnadňující validaci a posuzování podobných a modifikovaných metod založených na použití rekonstruované lidské epidermis v souladu se zásadami uvedenými v pokynu OECD č. 34 (8) (9). Odpovídající pokyn pro zkoušení byl původně přijat v roce 2010, v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební modely používající rekonstruovanou lidskou epidermis a dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu na měření životaschopnosti.

4. Pro čtyři komerčně dostupné zkušební modely *in vitro* založené na zkušebním systému RhE (citlivost 80 %, specifičnost 70 % a přesnost 75 %) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) byly provedeny prevalidační, optimalizační a validační studie. Uvedené čtyři zkušební modely jsou zařazeny v této zkušební metodě a uvedeny v dodatku 2, kde jsou také informace o typu validační studie použité pro validaci příslušných zkušebních metod. Jak se uvádí v dodatku 2, byla pro vývoj stávající zkušební metody a standardů funkčnosti použita validovaná referenční metoda (VRM) (8).

5. Vzájemné uznávání údajů podle OECD bude zaručeno pouze u zkušebních modelů validovaných podle standardů funkčnosti (8), pokud tyto zkušební modely byly podrobeny revizi a pokud je OECD přijala. Zkušební modely zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušebních metod pro dráždivé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.

6. Definice výrazů použitých v tomto dokumentu jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Jak prokazuje úplná prospektivní validační studie hodnotící a charakterizující zkušební metody RhE (16), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci chemických látek do volitelné kategorie 3 v rámci systému GHS OSN (slabě dráždivé látky) (1). Jak bude tato zkušební metoda používána určí tedy platný právní rámec členských zemí. Pro EU není kategorie 3 zařazena do nařízení CLP. Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jediné kožní expozici je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3). Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

8. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o poleptání kůže, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.40a (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) o poleptání kůže je založena na tomtéž zkušebním systému za použití rekonstruované lidské epidermis, i když podle jiného protokolu (6). Tato zkušební 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 tkání vedoucí ke vzniku lokalizovaného traumatu), k němuž dochází při podráždění *in vivo*. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemických látek a databáze validační studie obsahuje celkem 58 látek (16) (18) (23). Zkušební metodu lze používat pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek, žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny (29). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012 (30)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Podobně opatrně je třeba postupovat v případě, kdy se zjistí, že konkrétní chemické třídy nebo fyzikálně chemické vlastnosti nejsou u stávající zkušební metody použitelné.

10. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti buněk, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly (viz odstavce 28–34).

11. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití tří tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 50 ± 5 %, by se mělo zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

PRINCIP ZKOUŠKY

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

13. Chemicky vyvolané podráždění kůže, které se projevuje zejména zarudnutím (erytém) a otokem (edém), je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemických látek přes *stratum corneum*, kde mohou poškodit pod ním se nacházející vrstvy keratinocytů a další kožní buňky. Poškozené buňky mohou uvolňovat zánětlivé mediátory, nebo indukovat zánětlivou kaskádu, jež působí také na buňky v *dermis*, zejména na stromatické a endoteliální buňky cév. Jedná se o rozšíření a zvýšení propustnosti endoteliálních buněk, při nichž vzniká pozorovaný erytém a edém (29). Zejména zkušební metody na bázi RhE měří při nepřítomnosti vaskularizace ve zkušebním systému *in vitro* počáteční události kaskády, např. poškození buněk/tkání (16) (17), s využitím životaschopnosti buněk jako odečítané hodnoty.

14. Životaschopnost buněk v modelech RhE 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 (31). Dráždivé látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. ≤ 50 % pro dráždivé látky patřící v rámci systému GHS OSN / nařízení CLP do kategorie 2). V závislosti na právním rámci a použitelnosti zkušební metody lze zkoušené chemické látky, při jejichž použití životaschopnost buněk přesahuje definovanou prahovou úroveň, považovat za nedráždivé (tzn. > 50 %, „bez kategorie“).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

15. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů, který dodržuje tuto zkušební metodu (dodatek 2), měly by prokázat svou odbornou způsobilost pomocí deseti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (8)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1. Použití alternativní vhodné látky je třeba zdůvodnit.

16. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili 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 zkušební metoda úspěšně zavedena a je získána a prokázána způsobilost správně tuto metodu používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech posuzovat bariérové vlastnosti.

Tabulka 1

Vhodné látky [1]

Látka	Číslo CAS	Skóre *in vivo* [2]	Skupenství	Kategorie GHS OSN
NEKLASIFIKOVANÉ LÁTKY (bez kategorie GHS OSN)				
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	Pevná látka	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	Kapalina	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	1	Pevná látka	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	Kapalina	Bez kategorie *(Volitelná kat. 3)* [3]
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	Kapalina	Bez kategorie *(Volitelná kat. 3)* [3]
KLASIFIKOVANÉ LÁTKY (kategorie 2 GHS OSN)				
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Kapalina	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Kapalina	Kat. 2
hydroxid draselný (5 % vod.)	1310-58-3	3	Kapalina	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	3,3	Pevná látka	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Kapalina	Kat. 2

(1) Vhodné látky jsou podskupina látek používaných při validační studii a výběr vychází z těchto kritérií, i) chemické látky jsou komerčně dostupné; ii) jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky); iii) mají jasně definovanou chemickou strukturu; iv) jsou typickým příkladem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu; v) vykázaly reprodukovatelné výsledky *in vitro* v řadě zkoušek a laboratoří; vi) byly správně určeny *in vitro;* a vii) nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (např. karcinogenní látky, nebo nejde o látky toxické pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.

(2) Skóre *in vivo* podle zkušební metody B.4 (4).

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

POSTUP

17. Následuje popis složek a postupů zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis při posouzení dráždění kůže (viz také dodatek 3, kde jsou uvedeny parametry týkající se jednotlivých zkušebních modelů). Pro čtyři modely vhodné pro tuto zkušební metodu jsou k dispozici standardní prováděcí postupy (32) (33) (34) (35).

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Obecné podmínky

18. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční vrstvou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky 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

19. K určení životaschopnosti se používá zkouška MTT (31). Vitální buňky tkáňového modelu dokážou redukovat vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota (OD) samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody pro dráždění kůže) stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené 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 zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Bariérová funkce

20. Lipidové složení *stratum corneum* by mělo stačit na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3).

Morfologie

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

Reprodukovatelnost

22. Výsledky pozitivních a negativních kontrol zkušební metody by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

23. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 19), *bariérové funkce* (odstavec 20) a *morfologie* (odstavec 21). Tyto údaje by měly být poskytovány uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} by měl stanovit subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky, pokud jde o dráždivost, mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití náležitých tkání. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři zkušební modely zařazené do této zkušební metody.

Tabulka 3

Kvalitativní kritéria pro propouštění šarží zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(33)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 8,7 hod.
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(34)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 10,0 hod.
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hodin expozice za použití SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

24. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň tři replikáty. V případě kapalných a pevných chemických látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. od 26 do 83 µl/cm^2 nebo mg/cm^2 (viz dodatek 3). V případě pevných chemických látek je nutno povrch *epidermis* před nanesením zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem *epidermis*. Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. V některých případech lze použít jako aplikační pomůcku nylonovou síťku (viz dodatek 3). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout z povrchu epidermis vodným pufrem nebo 0,9 % roztokem NaCl. V závislosti na použitém zkušebním modelu RhE 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 zkušební metodu s použitím rekonstruované lidské epidermis a představují různé inherentní vlastnosti zkušebních modelů (např. bariérová funkce) (viz dodatek 3).

25. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly (NC) a pozitivní kontroly (PC), aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí historických hodnot přijatelnosti. Navrhovanou pozitivní kontrolou je 5 % vodný SDS. Navrhovanými látkami pro negativní kontrolu jsou voda nebo fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

Měření životaschopnosti buněk

26. Podle zkušebního postupu je velmi důležité, aby se měření životaschopnosti neprovádělo okamžitě po expozici působení zkoušené chemické látky, ale až po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření po opláchnutí tkáně v čerstvém médiu. Tato doba umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i vznik jasných známek cytotoxických účinků. V průběhu optimalizace zkoušek dvou zkušebních modelů na bázi RhE pro tuto zkušební metodu bylo zjištěno, že optimální inkubační doba je 42 hodin po expozici (11) (12) (13) (14) (15).

27. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda, která by se měla používat k měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové soustavy. Vzorek tkáně se na dobu 3 hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3–1 mg/ml). Životaschopné buňky přemění MTT na modrý formazan. Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ±30 nm, nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavec 34) (36).

28. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT (např. chemické látky mohou zabránit zabarvení, změnit zabarvení v opačné, nebo naopak mohou zabarvení způsobit) mohou zkoušku ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti. 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 (např. redukuje MTT), má přirozené zabarvení nebo se zabarví během svého působení na tkáň, pak jsou ke zjištění interference zkoušené chemické látky s postupem měření životaschopnosti buněk a ke korekci této interference zapotřebí dodatečné kontroly (viz odstavce 29 a 33). Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, naleznete ve standardních prováděcích postupech výše uvedených čtyř validovaných modelů zařazených do této zkušební metody (32) (33) (34) (35).

29. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné tkáně RhE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo k nespecifické redukci MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).

30. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 33 a 34). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v médiu bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).

31. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 29) a působí barevné interference (viz odstavec 30), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí sadu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících se zkouškou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 29.

Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).

32. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearity svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru, nebo když je nekorigovaná procentuální životaschopnost zjištěná u zkoušené chemické látky již ≤ 50 %, je vhodné standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} ≥ 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to hraniční hodnota používaná na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 36).

33. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní spektrofotometrický postup HPLC/UPLC měření formazanu MTT (viz odstavec 34) (36). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 29). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

34. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro sadu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36) (37). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

35. U každé zkušební metody s použitím platných šarží modelu rekonstruované lidské epidermis (viz odstavec 23) by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle závěrečné zprávy. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. 5 % vodným SDS, měly odrážet svou schopnost reagovat na dráždivou chemickou látku v podmínkách zkušební metody (viz dodatek 3 a standardní prováděcí postupy čtyř zkušebních modelů zařazených do tohoto pokynu pro zkoušení (32) (33) (34) (35). Související vhodné hodnoty variability mezi tkáňovými replikáty, tj. směrodatné odchylky (SD), by měly být v mezích přijatelnosti stanovených pro použitý zkušební model (viz dodatek 3).

Interpretace výsledků a predikční model

36. Hodnoty OD získané s každou zkoušenou chemickou látkou lze použít k výpočtu procentuálního podílu životaschopnosti buněk normalizovaného podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Je zapotřebí jasně vymezit, zdokumentovat a v případě potřeby prokázat mezní hodnotu procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišující dráždivou látku od neklasifikovaných zkoušených chemických látek a statistický postup (statistické postupy) použitý k vyhodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek (viz standardní prováděcí postupy zkušebních modelů, kde jsou uvedeny informace). Mezní hodnoty pro predikci dráždění jsou uvedeny níže:

— Zkoušená chemická látka je považována za látku vyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP (kategorie 2 nebo kategorie 1), jestliže je střední procentuální životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna (≤) 50 %. Protože zkušební modely RhE zahrnuté v této zkušební metodě nedokážou rozlišovat mezi kategorií 1 a kategorií 2 GHS OSN/CLP, budou nutné další informace o leptavých účincích na kůži, aby bylo možné rozhodnout o její konečné klasifikaci [viz také pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3)]. Pokud je zjištěno, že je zkoušená chemická látka nežíravá (např. podle zkušebních metod TM.40, B.40a nebo B.65) a vykazuje životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší než nebo rovnou (≤) 50 %, považuje se tato zkoušená chemická látka za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 GHS OSN/CLP.

— V závislosti na právním rámci v členských zemích lze zkoušenou chemickou látku považovat za nedráždivou pro kůži v souladu s označením „bez kategorie“ v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření větší než (>) 50 %.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. 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 chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Navíc je za každé provedení zkoušky nutno vykázat průměr ± směrodatnou odchylku. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolních chemických látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol (a případné zdůvodnění jeho volby)

Zkušební podmínky:

— použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),

— kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení, popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC, 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,

— odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zahrnovat přinejmenším přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na historické údaje o šaržích,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

— podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici), dávka zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,

— doba a teplota expozice a doba inkubace po ošetření,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}),

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

— střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji, přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

— tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách pro každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně a běžných odchylek,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, směrodatné odchylky, konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,

— výsledky získané u zkoušené chemické látky / zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013 (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC), druhé revidované vydání, OSN New York a Ženeva). Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EC EURL-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 (ESAC31), 9 April 2009. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(5) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).

(6) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).

(7) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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., 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., 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.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EC EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Poznámka: Jsou to původní standardy funkčnosti použité pro validaci dvou zkušebních metod. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8).*

(22) EURL-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. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 159) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 155) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) 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.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. (Připravovaný rukopis).

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na internetových stránkách: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) 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.

(39) EC EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Poznámka: Jde o aktuální verzi standardů funkčnosti ECVAM aktualizovanou v roce 2009 s ohledem na provedení GHS OSN. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8) týkající se tohoto pokynu.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, *Úřední věstník Evropské unie* L 225, 21.8.2001, s. 1.

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

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

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních modelů, které dává kategorický výsledek a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost" a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

ET_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC_{50}.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek podle OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET_{50}.

Nekonečná dávka: množství zkoušené chemické látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NSC_{killed}: nespecifická barva u neživých tkání.

NSC_{living}: nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební 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 referenčních látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních látek (9).

Pozitivní kontrola (PC): replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu v průběhu času bude možné vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

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: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím 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 k 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 chemické látky (9).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

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

Dráždění kůže *in vivo*: vyvolání reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené chemické látky po dobu až 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající reakce postižené kožní tkáně, která se objevuje krátce po stimulaci (38). Je způsobena lokální zánětlivou reakcí zahrnující vlastní (nespecifický) imunitní systém kožní tkáně. Její hlavní charakteristikou je reverzibilní proces zahrnující zánětlivé reakce a většinu klinických charakteristických příznaků dráždění (erytém, edém, svědění a bolest) v souvislosti se zánětlivým procesem.

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

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál. [[G1]]

Dodatek 2

ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Č.	Název zkušebního modelu	Druh validační studie	Odkazy
1	EpiSkin™	Úplná prospektivní validační studie (2003–2007). Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušební metody původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21) (*) . Kromě toho tvořily údaje z této metody týkající se určení neklasifikovaných a klasifikovaných látek hlavní východisko pro definování hodnot specifičnosti a citlivosti původních standardů funkčnosti (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*originál*): Původně prošel tento zkušební model úplnou prospektivní validací společně s č. 1 z let 2003–2007. Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušebních metod původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21). (*) **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Modifikace původního modelu EpiDerm™ byla validována v roce 2008 s použitím původních standardů funkčnosti ECVAM (21) (*).	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validační studie vycházející z původních standardů funkčnosti ECVAM (21) v roce 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validační studie (2011–2012) vycházející ze standardů funkčnosti podle Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (8), které jsou založeny na aktualizovaných standardech funkčnosti ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) a standardy funkčnosti tohoto pokynu pro zkoušení (8) (*)

(*) Původní standardy funkčnosti ECVAM (21) byly vypracovány v roce 2007 po dokončení prospektivní validační studie (16), která hodnotila funkčnost zkušebních modelů č. 1 a 2 podle klasifikačního systému popsaného v 28. změně směrnice EU o nebezpečných látkách (41). V roce 2008 byly zavedeny globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS OSN) (1) a nařízení CLP, které ve skutečnosti posunuly mezní hodnotu pro rozlišování neklasifikovaných látek od klasifikovaných ze skóre *in vivo* 2,0 na 2,3. Za účelem přizpůsobení se tomuto změněnému regulatornímu požadavku byly v roce 2009 aktualizovány hodnoty přesnosti a seznam referenčních chemických látek podle standardů funkčnosti ECVAM (2) (39) (40). Stejně jako původní standardy funkčnosti také aktualizované standardy funkčnosti vycházely do značné míry z údajů z modelů č. 1 a 2 (16), ale kromě toho používaly také údaje o referenčních chemických látkách z modelu č. 3. V roce 2010 byly použity aktualizované standardy funkčnosti ECVAM pro stanovení standardů funkčnosti týkajících se tohoto pokynu pro zkoušení (8). Pro účely této zkušební metody se model EpiSkin™ považuje za validovanou referenční metodu, a to vzhledem ke skutečnosti, že byl použit na vypracování všech kritérií standardů funkčnosti. Podrobné informace o validačních studiích, sbírku vytvořených údajů, jakož i obecné informace o potřebných úpravách standardů funkčnosti v důsledku používání systému GHS OSN/CLP lze najít ve vysvětlujícím podkladovém dokumentu ECVAM/BfR k odpovídajícímu Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (23).

SIT: Zkouška dráždivosti pro kůži

RHE: Rekonstruovaná lidská epidermis

Dodatek 3

PARAMETRY PROTOKOLU SPECIFICKÉ PRO JEDNOTLIVÉ ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Modely RhE mají velmi podobné protokoly a všechny tyto protokoly používají zejména dobu po inkubaci 42 hodin (32) (33) (34) (35). Odchylky se týkají hlavně tří parametrů souvisejících s různými bariérovými funkcemi zkušebních modelů, které jsou zde uvedeny: A) doba a objem před inkubací, B) aplikace zkoušených chemických látek a C) objem po inkubaci.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Předběžná inkubace				
Inkubační doba	18–24 hodiny	18–24 hodiny	< 2 hodiny	15–30 hodin
Střední objem	2 ml	0,9 ml	0,3 nebo 1 ml	0,5 ml
B) Aplikace zkoušené chemické látky				
Na kapaliny	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Na pevné látky	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Použití nylonové síťky	Nepoužito	Pokud je třeba	Použito	Nepoužito
Celková doba aplikace	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Teplota aplikace	RT	a) 25 minut při pokojové teplotě a) 35 minut při 37 °C	RT	RT
C) Objem po inkubaci				
Střední objem	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximální přípustná variabilita				
Směrodatná odchylka mezi tkáňovými replikáty	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

RT:: pokojová teplota
DW:: destilovaná voda
DPBS:: Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru

Dodatek 4

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(37)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$ [1]
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤ % vlivu matrice ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu podle standardu ULOQ [2]	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	%Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: dolní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.
[2] ULOQ: horní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 µg/ml. [[G1]]

(8) V části B se doplňují tyto kapitoly:

„B.63 **SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 421 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 421 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1995 na základě protokolu pro „Předběžnou screeningovou zkoušku na reprodukční toxicitu" projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).

2. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti pro endokrinní disruptory v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů ke zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (3). Například do Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců – 28denní opakovaná aplikace, kapitola B.7 této přílohy) byly v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 421 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti týkající se endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).

3. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (4) byly do pokynu č. 421 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, kapitola B.56 této přílohy).

4. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako jsou funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Tuto screeningovou zkušební metodu lze použít na získání prvních informací o možných účincích na reprodukci anebo vývoj, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Rovněž může být použita jako součást sady úvodních screeningových zkoušek u stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (5).

6. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k relativně malému počtu zvířat ve skupinách dávkování, selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.

7. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy" (6). V tomto koncepčním rámci je vylepšený Pokdyn OECD pro zkoušení č. 421 zařazena na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.

8. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.

9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

10. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

12. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.

13. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].

14. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu doby zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v této zkušební metodě zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (odpovídající kapitole B.7 této přílohy) byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřipuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

16. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22° C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

17. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.

18. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

19. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

20. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat v potravě nebo v pitné vodě.

21. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit jako první variantu použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec eventuální použití roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

22. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F_1 od doby početí do 13. dne po porodu.

Dávkování

23. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Úrovně dávek mohou vycházet z údajů ze zkoušek akutní toxicity nebo z výsledků studií po opakované dávce. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.

24. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Poté by se měla zvolit sestupná řada úrovní dávek, aby se prokázala odezva související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků (NOAEL) při nejnižší úrovni dávky. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem vyšším než 10).

25. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

26. Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů popsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjistitelnou toxicitu, a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně příbuzných látkách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň koncentrace často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

Podávání dávek

27. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

28. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

Harmonogram zkoušky

29. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno alespoň 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stáří 10 týdnů, potkan Wistar stáří přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utraceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.

30. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utracením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však v PND 4.

31. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Páření

32. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

Velikost vrhu

33. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mláďat/vrh), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

34. Jestliže se velikost trhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mláďata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mláďaty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mláďat nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mláďat/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

Pozorování živých zvířat

Poznatky z klinického pozorování

35. Po celou dobu zkoušky by se mělo provádět všeobecné klinické pozorování nejméně jednou denně a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Tyto záznamy by měly zahrnovat čas nástupu, stupeň a délku trvání známek toxicity.

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

36. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.

37. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává v pitné vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba vody.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 22). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly, mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba dávat pozor, aby se neporušila sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (7) (8).

Parametry potomstva

39. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.

40. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování popsaných v odstavci 35 je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.

41. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (9). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (10).

Biochemické vyšetření

42. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:

— od alespoň dvou mláďat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mláďat (viz odstavce 33-34)

— od všech samic a alespoň dvou mláďat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a

— od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mláďatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mláďatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů: Krev mláďat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celkové".

43. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

44. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.

Patologie

Celková pitva

45. Dospělá zvířata se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na abnormality nebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. Ráno v den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením vaječníků.

46. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě.

47. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje. 13. den se uchová štítná žláza od 1 mladého samce a 1 mladé samice z každého vrhu.

48. Vaječníky a varlata, přídatné pohlavní orgány (děloha a děložní hrdlo, nadvarlata, prostata, semenné váčky s Cowperovými žlázami), štítná žláza a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovají. Pro rutinní vyšetření varlat a nadvarlat se nedoporučuje fixace ve formalínu. Přípustnou metodou pro tyto tkáně je použití Bouinova fixačního roztoku nebo modifikovaného Davidsonova fixačního roztoku (11). Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa.

Histopatologie

49. Podrobné histologické vyšetření je třeba provést u vaječníků, varlat a nadvarlat (se zvláštním důrazem na stádia spermatogeneze a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat) zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a v kontrolní skupině. V případě potřeby mohou být vyšetřeny i další uchované orgány včetně štítné žlázy od mláďat a dospělých zvířat. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Vyšetření by měla být provedena také u zvířat ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s nejvyšší dávkou pozorovány změny. Pokyny k histopatologickému vyšetření (11) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

50. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.

51. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti" pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolená metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k malé velikosti skupin může být jako pomůcka pro interpretaci studie také užitečné použití historických kontrolních údajů (např. o velikosti vrhu), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

Vyhodnocení výsledků

52. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.

53. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

54. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

55. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, věk a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použitých koncentracích, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody, je-li údaj k dispozici,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,

— délka gestace,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— údaje o tělesné hmotnosti mláďat,

— AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),

— retenční mléčné cysty u mláďat samců,

— hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),

— počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

Interpretace výsledků

56. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek (viz odstavce 5 a 6). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (12). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (11) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tento pokyn užitečné.

LITERATURA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 217) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ POKYNY OECD Č. 150 (6))

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. $T_{3)}$.

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita: projev reprodukční toxicity představující prenatální, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita: nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek).

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17ß).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

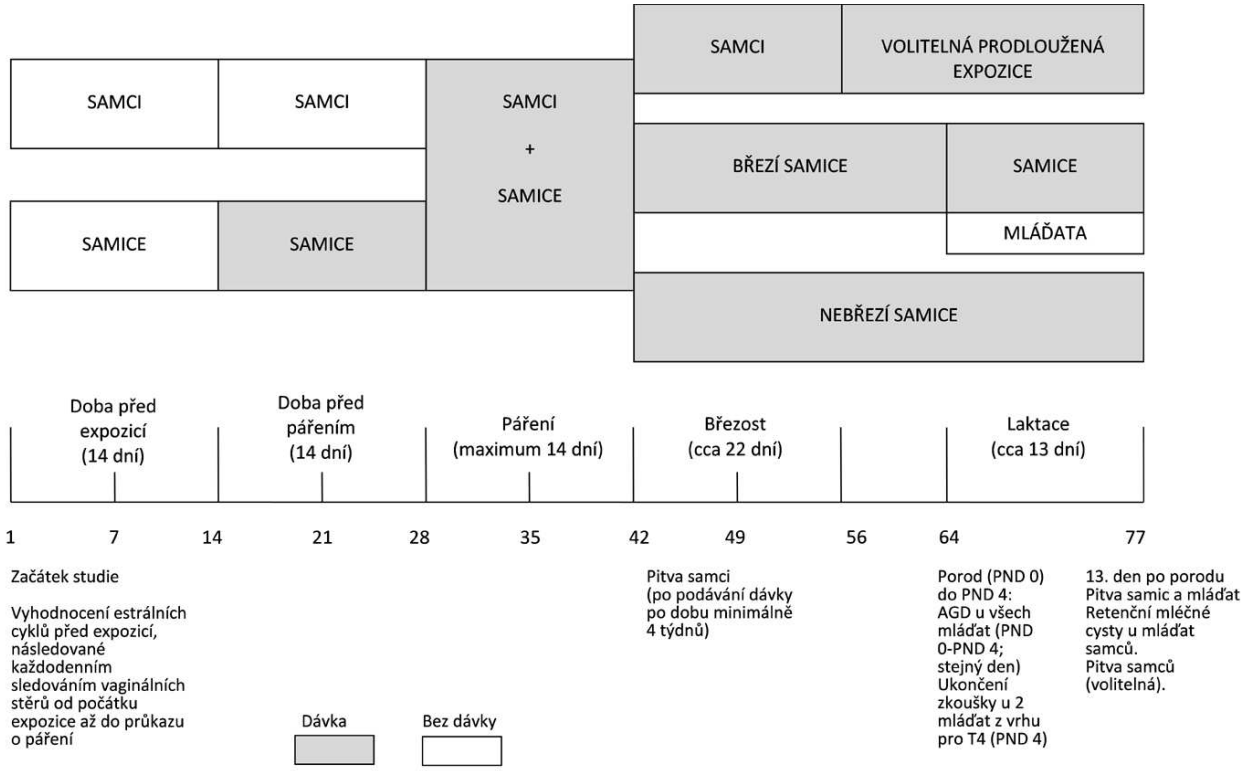
Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. $T_{3)}$ v savčím organismu.

Validace je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevantnost pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE, NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ



Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–... [1] (N)					
Březost ≤ 21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					
Hmotnost mláďat v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					
AGD mláďat ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Hmotnost mláďat 4. den (průměr)					
Retenční mléčné cysty u mladých samců 13. den (průměr)					
Hmotnost mláďat 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální/postimplantační (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

([1]) poslední den období páření

B.64 KOMBINOVANÁ STUDIE TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKÁCH SE SCREENINGOVOU ZKOUŠKOU NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 422 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 422 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1996 na základě protokolu pro „Kombinovanou screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu po opakovaných dávkách" projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).

2. Tato zkušební metoda kombinuje screeningovou část na reprodukční/vývojovou toxicitu, která vychází ze zkušeností získaných v členských zemích při používání původní metody u stávajících chemických látek vyráběných ve velkém objemu a při průzkumném testování látek pozitivní kontroly (3) (4), a část zkoušení toxicity po opakovaných dávkách v souladu s Pokynem OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců s opakovaným podáváním dávky v 28denním cyklu, odpovídající kapitole B.7 této přílohy).

3. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti endokrinnch disruptorů v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů pro zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (5). V této souvislosti byly do pokynu č. 407 (odpovídajícího kapitole B.7 této přílohy) v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 422 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).

4. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (6) byly do pokynu č. 422 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, odpovídající kapitole B.56 této přílohy).

5. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze po získání prvních informací o toxicitě z akutních zkoušek stanovit orální toxicitu pomocí opakované aplikace dávek. Tato studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit na základě opakované expozice během relativně omezeného časového období. Tato metoda se skládá ze základní studie toxicity po opakovaných dávkách, kterou lze použít u chemických látek, u nichž není důvod pro 90denní studii (např. když objem výroby nepřekračuje určité limity), nebo jako předběžnou studii k dlouhodobé studii. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnoceních bezpečnosti (7).

7. Dále zahrnuje screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu, a proto může být použita také na získání prvních informací o možných účincích na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností zkoušených chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným reprodukčním/vývojovým účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.

8. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (8). V tomto koncepčním rámci je vylepšený Pokyn OECD pro zkoušení č. 422 zařazen na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.

9. Tato zkušební metoda klade rovněž větší důraz na neurologické účinky jako na specifické sledované vlastnosti; důraz je kladen na potřebu pečlivého klinického pozorování zvířat, aby bylo získáno co nejvíce informací. Metoda by měla odhalit chemické látky s neurotoxickým potenciálem, u nichž může být nezbytné další hlubší zkoumání tohoto aspektu. Dále může tato metoda poskytnout základní indikaci imunologických účinků.

10. Pokud neexistují údaje z jiných studií systémové toxicity, reprodukční/vývojové toxicity, neurotoxicity anebo imunotoxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek. Zkouška však může být zvláště užitečná jako součást souboru údajů pro hodnocení OECD (SIDS) pro posouzení stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, a může sloužit jako alternativa k provedení dvou samostatných zkoušek toxicity po opakovaných dávkách (Pokyn OECD pro zkoušení č. 407, odpovídající kapitole B.7 této přílohy), respektive reprodukční/vývojové toxicity (Pokyn OECD pro zkoušení č. 421, odpovídající kapitole B.63 této přílohy). Rovněž může být použita jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní.

11. Obecně se předpokládá, že existují rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Proto může být složitější stanovit úroveň dávek v této kombinované zkoušce, která bude adekvátní pro posouzení jak obecné systémové toxicity, tak i specifické reprodukční/vývojové toxicity, než když se jednotlivé zkoušky provádějí zvlášť. Navíc může být obtížnější interpretovat výsledky zkoušek s ohledem na obecnou systémovou toxicitu, než když se provádí samostatná studie s opakovanými dávkami, zejména když se sérové a histopatologické parametry nehodnotí ve studii současně. Vzhledem k uvedeným technickým problémům jsou pro provádění této kombinované screeningové zkoušky nutné značné zkušenosti v oblasti zkoušení toxicity. Na druhé straně může kombinovaná zkouška nabídnout kromě menšího počtu použitých zvířat lepší prostředky pro rozlišení přímých účinků na reprodukci/vývoj od účinků, které jsou sekundární k jiným (systémovým) účinkům.

12. V této zkoušce je období podávání zkoušené chemické látky delší než v klasické 28denní studii s opakovanou dávkou. V porovnání se stavem, kdy se provádí klasická 28denní studie s opakovanou dávkou kromě screeningové zkoušky reprodukční/vývojové toxicity, se však používá méně zvířat každého pohlaví na skupinu.

13. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.

14. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

15. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

16. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést

podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

17. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.

18. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].

19. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

20. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v tomto pokynu pro zkoušení č. 422 zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí pokynu pro zkoušení č. 407 byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nízkou plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřipuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

21. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °). Relativní vlhkost vzduchu by měla být alespoň 30 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

22. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.

23. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

24. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně vyberou a rozdělí do experimentálních skupin a klecí. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

25. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat také v potravě nebo v pitné vodě.

26. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Kdykoli je to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití olejového roztoku/emulze (např. kukuřičného oleje) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

27. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F_1 od doby početí do dne 13 po porodu. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Mělo by se zvážit přidání další satelitní skupiny pěti zvířat od každého pohlaví do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po dobu nejméně 14 dní po ukončení aplikace mohla sledovat vratnost, přetrvávání nebo opožděný nástup systémových toxických účinků. Zvířata ze satelitních skupin se nepáří, a proto se nepoužívají pro posouzení reprodukční/vývojové toxicity.

Dávkování

28. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Nejsou-li dostupné žádné vhodné obecné údaje o toxicitě, může se provést předběžná studie (na zvířatech stejného kmene a původu) pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.

29. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, nikoli však uhynutí ani velké utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje odezva související s dávkou a že nejnižší dávka nevyvolává žádné nežádoucí účinky. Obvykle jsou optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly mezi dávkami a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání příliš velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem větším než 10).

30. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

31. Pokud orální studie provedená podle postupů popsaných pro tuto studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v potravě nebo v pitné vodě v rovnocenné koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití několika úrovní dávek nutná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná expozice často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

Podávání dávek

32. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento

objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

33. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je kombinovaná studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé nebo úplné studii reprodukční toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

Harmonogram zkoušky

34. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stáří 10 týdnů, potkan Wistar stáří přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utraceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Aby bylo možné odebrat krev samicím nalačno (pokud je dávána přednost této možnosti), není nutné, aby byly samice a jejich potomstvo utraceny ve stejný den. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.

35. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utracením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však 4. postnatální den (PND).

36. Pokud je zařazena satelitní skupina, pak zvířata v této skupině, která mají být podle plánu dále sledována, se nepáří. Měla by být po dalších nejméně 14 dnů po prvním naplánovaném utracení samic bez aplikace, aby se zachytil opožděný nástup či přetrvávání toxických účinků nebo zotavení se z nich.

37. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 27). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly, mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (8) (9).

Páření

39. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). V případě, že páření bylo neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

Velikost vrhu

40. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mláďat/vrh), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

41. Jestliže se velikost trhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mláďata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mláďaty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mláďat nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mláďat/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

Pozorování

42. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

43. Před expozicí látce a dále nejméně jednou týdně by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech rodičovských zvířat (za účelem intraindividuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe každý den ve stejnou dobu. Pozorování je třeba pečlivě zaznamenat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby rozdíly ve zkušebních podmínkách byly co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nevědí, jakým testem zvířata procházejí. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení), ztížený nebo prodlužovaný vrh nebo bizarní chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (10).

44. Jednou v průběhu studie by se měly u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny vyšetřit reakce na smyslové podněty různého druhu (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), (8), (9), (11), síla úchopu (12) a motorická aktivita (13). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy. U samců by měla tato funkční pozorování proběhnout ke konci období, kdy je jim podávána zkoušená chemická látka, krátce před naplánovaným utracením, ale před odběrem krve pro hematologické vyšetření nebo stanovení klinických biochemických ukazatelů (viz odstavce 53–56, včetně poznámky pod čarou č. 1). Samice by měly být v průběhu těchto funkčních zkoušek ve fyziologicky podobném stavu a měly by být testovány nejlépe jednou v průběhu posledního týdne laktace (např. LD 6–13), krátce před plánovaným utracením. V maximálně možné míře minimalizujte dobu oddělení samic od mláďat.

45. Pozorování funkčních poruch provedené jednou ke konci studie lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) nebo dlouhodobou studii. V takovém případě by se mělo pozorování funkčních poruch zahrnout do této dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách z této studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou nebo dlouhodobou studii.

46. Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

47. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.

48. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování zvířat rodičovské generace (viz odstavce 43 a 44) je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.

49. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (14). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (15).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

50. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.

51. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává ve vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba tohoto média.

Hematologická vyšetření

52. Jednou v průběhu studie by se měla u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny tato hematologická provést vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, retikulocytů, celkového počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a trombocytů a stanovení protrombinového času. Jestliže zkoušená chemická látka nebo její domnělé metabolity mají oxidační vlastnosti nebo existuje podezření, že je mají, měly by se stanovit také koncentrace methemoglobinu a Heinzových tělísek.

53. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa. Samice by měly být při odběru ve fyziologicky podobném stavu. Za účelem vyloučení praktických problémů spojených s variabilitou při nástupu gestace se může samicím odebírat krev na konci období před pářením jako alternativa k odběru těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. U samců se krev odebírá nejlépe těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. Alternativně lze samcům odebírat krev také na konci období před pářením, pokud byla tato doba vybrána pro samice.

54. Krevní vzorky je třeba skladovat za vhodných podmínek.

Biochemické vyšetření

55. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích od pěti vybraných samců a pěti vybraných samic z každé skupiny. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc nalačno ([1]). Vyšetření plazmy a séra by mělo obsahovat stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako je alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, a sorbitoldehydrogenáza) a žlučových kyselin. Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a bilirubinu může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

56. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:

— od alespoň dvou mláďat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mláďat (viz odstavce 40–41),

— od všech samic a alespoň dvou mláďat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a

— od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mláďatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mláďatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů. Krev mláďat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celek".

([1]) Pro řadu vyšetření séra a plazmy, zejména na glukózu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně může mít hladovění přes noc vliv na celkový metabolismus (březích) zvířat, narušovat laktaci a chování při kojení a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Pokud se krev odebírá nalačno, měla by se klinická biochemická vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu studie u samců. Samice by se měly ponechat jeden další den po odejmutí mláďat například v den PND 13). Od 13.–14. dne laktace by samicím měly být nalačno odebrány závěrečné vzorky krve pro provedení závěrečných klinických biochemických vyšetření.

57. Volitelně mohou být provedena tato vyšetření moči u pěti náhodně vybraných samců z každé skupiny v průběhu posledního týdne studie za použití časově definovaného sběru moči; vyšetření se týkají vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukózy a krve/krvinek.

58. Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené chemické látky ovlivnit odpovídající metabolické profily, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů na lačno a glukózy na lačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterázy. To je třeba stanovit individuálně.

59. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

60. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.

61. Pokud nejsou údaje o výchozích hodnotách z dřívějších pozorování dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem podávání dávky nebo přednostně u skupiny zvířat nezahrnutých do experimentálních skupin. U samic musí být údaje od zvířat v laktaci.

PATOLOGIE

Celková pitva

62. U všech dospělých zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. V den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením samičích reprodukčních orgánů.

63. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě. Vaječníky, varlata, nadvarlata, přídatné pohlavní orgány a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovají.

64. Pro účely následného histopatologického vyšetření se uchovají v nejvhodnějším fixačním médiu štítné žlázy od všech dospělých samců a samic a od jednoho 13denního samce a jedné 13denní samice z každého vrhu. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek (viz odstavec 56).

65. Dále se játra, ledviny, nadledvinky, brzlík, slezina, mozek a srdce od alespoň pěti dospělých samců a samic náhodně vybraných z každé skupiny (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených před ukončením studie) podle potřeby zbaví všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny makroskopicky viditelné léze, mozek (reprezentativní oblasti zahrnující hemisféry, mozeček a most), mícha, oko, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), gonády (varlata a vaječníky), přídatné pohlavní orgány (děloha a hrdlo děložní, nadvarlata, prostata, semenné váčky s Cowperovými žlázami), vagina, močový měchýř, lymfatické uzliny (kromě nejproximálnější svodné uzliny by se měla odebrat ještě jedna uzlina dle laboratorních zkušeností (16)), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis) přednostně v blízkosti svalu, kosterní sval a kost, s kostní dření (řez nebo čerstvý nátěr z aspirované kostní

dřeně). Doporučuje se fixovat varlata ponořením do Bouinova nebo modifikovaného Davidsonova fixačního média (16) (17) (18); pro tyto tkáně se nedoporučuje fixace ve formalínu. Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány.

66. Následující tkáně mohou poskytnout cenné svědectví o endokrinních účincích: gonády (vaječníky a varlata), přídatné pohlavní orgány (děloha včetně děložního hrdla, nadvarlata, semenné váčky s Cowperovými žlázami, dorzolaterální a ventrální prostata), vagina, hypofýza, samčí prsní žláza a nadledvinka. Změny na samčích prsních žlázách nebyly dostatečně zdokumentovány, avšak tento parametr může být velmi citlivý na látky s estrogenním působením. Pozorování orgánů/tkání, které nejsou uvedeny v odstavci 65, jsou volitelná.

67. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

Histopatologie

68. U vybraných zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání (se zvláštním důrazem na stádia spermatogeneze samčích gonád a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat). V případě potřeby může být vyšetřena štítná žláza od mláďat a zbývajících dospělých zvířat. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata z ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou. Pokyny k histopatologickému vyšetření (10) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

69. Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze. Za účelem objasnění hodnot dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) je třeba vyšetřit cílové orgány v jiných dávkových skupinách, zejména ve skupinách, které údajně vykazují hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku.

70. V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

71. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.

72. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Srovnáním účinků v celém rozpětí dávkování by se mělo zamezit použití mnohonásobných t-testů. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti“ pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Některé nejčastěji používané metody, zejména parametrické testy na měření středního trendu, jsou nevhodné. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolená metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie.

Vyhodnocení výsledků

73. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.

74. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

75. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

76. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a, je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, věk a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,

— délka gestace,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,

— hematologická vyšetření s příslušnými základními hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,

— údaje o tělesné hmotnosti mláďat,

— AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),

— retenční mléčné cysty u mláďat samců,

— hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

Interpretace výsledků

77. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na sledované vlastnosti všeobecné toxicity i na sledované vlastnosti reprodukční/vývojové toxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi reprodukčními/vývojovými účinky vyskytujícími se za nepřítomnosti všeobecné toxicity a účinky projevujícími se pouze při úrovních, které jsou toxické i pro rodičovská zvířata (viz odstavce 7–11). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (19). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (16) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tuto zkušební metodu užitečné.

LITERATURA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Environ. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol.* Appl. *Pharmacol.*, 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol.*, 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ (20) POKYN OECD Č. 150)

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T_3).

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita projev reprodukční toxicity představující prenatální, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek), které souvisí s graviditou.

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17ß).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

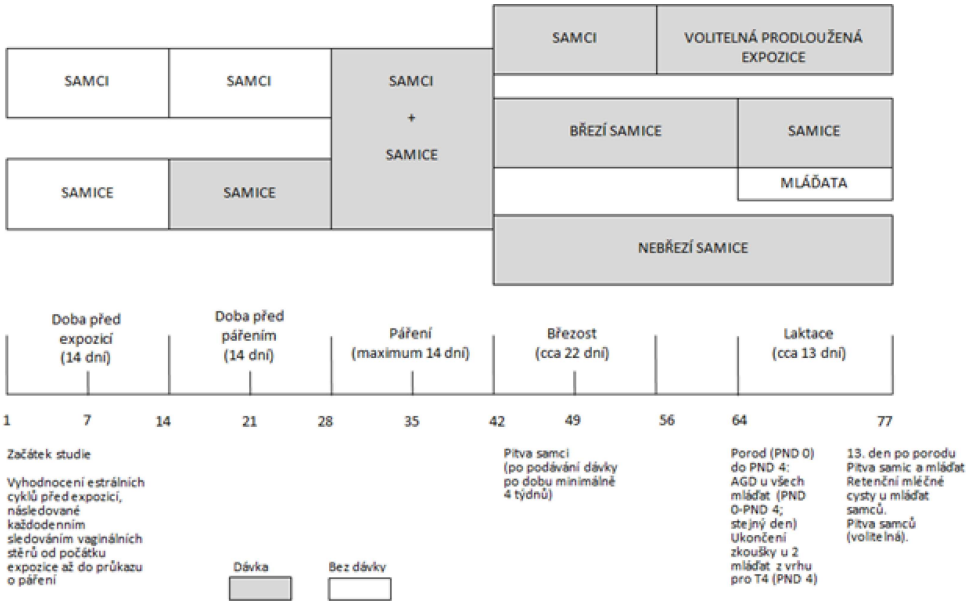
Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

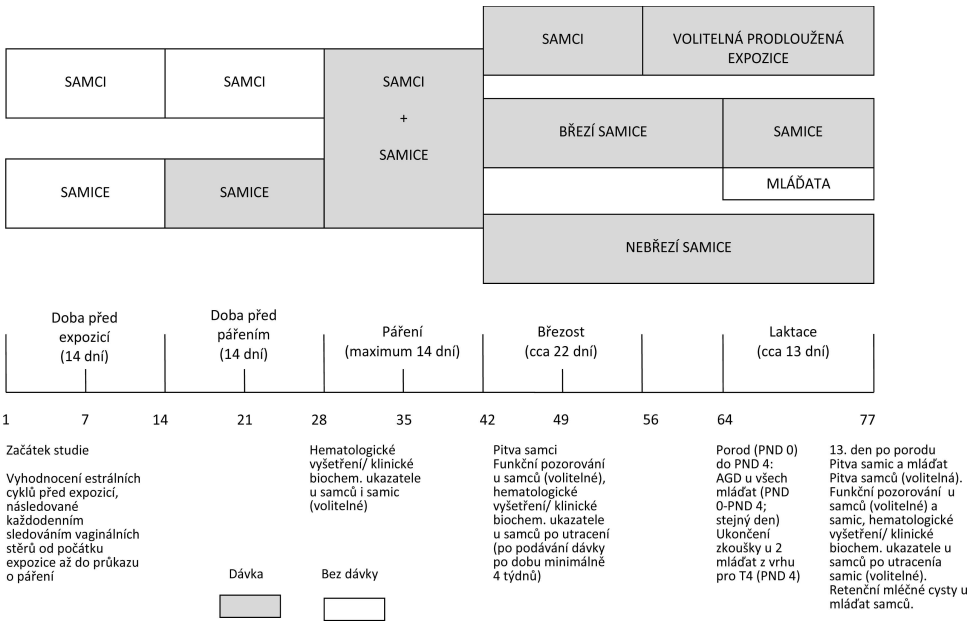
Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T_3) v organismu savců.

Validace je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevantnost pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ





Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky).....	0 (kontrola)	...	...	...	...
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–...[(1)] (N)					
Březost≤21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					
Hmotnost mláďat v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					
AGD mláďat ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Hmotnost mláďat 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat 13. den (průměr)					
Retenční mléčné cysty u mladých samců 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

([1]) poslední den období páření

B.65 ZKUŠEBNÍ METODA S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVÉ BARIÉRY *IN VITRO* PRO LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 435 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP") ([1]). Tato zkušební metoda, rovnocenná aktualizovanému Pokynu OECD pro zkoušení č. 435, představuje zkušební metodu s využitím membránové bariéry *in vitro*, kterou lze použít na určení žíravých chemických látek. Zkušební metoda využívá umělou membránu navrženou tak, aby reagovala na žíravé chemické látky podobně jako zvířecí kůže *in situ*.

2. Leptavé účinky na kůži se tradičně posuzují aplikací zkoušené chemické látky na kůži živých zvířat, kdy se vyhodnotí rozsah poškození tkáně po stanoveném časovém období (2). Kromě této zkušební metody byla přijata řada jiných zkušebních metod *in vitro* jako alternativy (3) (4) ke standardnímu postupu zkoušení na kůži králíka *in vivo* (kapitola B.4 této přílohy, rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 104), který se používá na určení žíravých chemických látek (2). Strategie odstupňovaného zkoušení a hodnocení podle systému GHS OSN pro hodnocení a klasifikaci leptavých účinků na kůži a dokument OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) látek dráždivých/leptavých pro kůži doporučuje použití validovaných a uznávaných zkušebních metod *in vitro* podle modulů 3 a 4 (1) (5). Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů, které seskupují informační zdroje a analytické nástroje, a i) poskytují návod na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhují přístup, když je nutné další zkoušení, včetně případů, kdy jsou zjištěny negativní výsledky (5). V tomto modulárním přístupu mohou být pozitivní výsledky zkušebních metod *in vitro* použity pro klasifikaci chemické látky jako žíravé bez nutnosti zkoušek na zvířatech, čímž se snižuje a kultivuje použití zvířat a vyloučí se bolest a stres, k nimž může dojít, když jsou pro tento účel používána zvířata.

3. Byly dokončeny validační studie pro model s membránovou bariérou *in vitro*, které jsou komerčně dostupné jako Corrositex® (6)(7)(8), vykazující celkovou přesnost predikce leptavých účinků na kůži 79 % (128/163), citlivost 85 % (76/89) a specifičnost 70 % (52/74) u databáze 163 látek a směsí (7). Na základě uznávané validity byla tato validovaná referenční metoda (VRM) doporučena pro použití jako součást strategie odstupňovaného zkoušení pro hodnocení potenciálního rizika leptavých účinků chemických látek na kůži (5) (7). Před použitím použít modelu s membránovou bariérou *in vitro* pro leptavé účinky na kůži pro regulační účely, je zapotřebí stanovit jeho spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jeho navrhovaného použití, aby se zajistila jeho podobnost s VRM (9) v souladu se stanovenými požadavky standardů funkčnosti (10). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do rovnocenného pokynu OECD pro zkoušení. V současnosti se Pokyn OECD pro zkoušení č. 435 a tato zkušební metoda týká pouze jedné metody *in vitro*, a to komerčně dostupného modelu Corrositex®.

4. Jiné zkušební metody pro zkoušení leptavých účinků na kůži vycházejí z použití rekonstruované lidské kůže (Pokyn OECD pro zkoušení č. 431) (3) a izolované kůže potkana (Pokyn OECD pro zkoušení č. 430) (4). Tento pokyn také stanoví podrobnější klasifikaci žíravých chemických látek do tří podkategorií žíravých látek podle systému GHS OSN a tří přepravních obalových skupin podle systému OSN pro nebezpečí žíravé látky. Tento pokyn byl původně přijat v roce 2006 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA a aktualizaci seznamu vhodných látek.

DEFINICE

5. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Zkouška popsaná v této zkušební metodě umožňuje určení žíravých zkoušených látek a dále umožňuje podrobnou klasifikaci žíravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN/CLP (tabulka 1). Kromě toho může být taková zkušební metoda použita pro rozhodnutí o žíravosti a nežíravosti konkrétních tříd chemických látek, např. organických a anorganických kyselin, derivátů kyselin ([2]) a zásad pro některé účely zkoušení v oblasti přepravy (7)(11)(12). Tato zkušební metoda popisuje obecný postup podobný validované referenční zkušební metodě (7). I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti

([1]) 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.

([2]) „Derivát kyseliny" je nespecifické označení třídy a obecně je definován jako chemická látka vzniklá z kyseliny buď přímo, anebo v důsledku úpravy či částečné substituce. Tato třída zahrnuje anhydridy, halogenové kyseliny, soli a jiné druhy chemických látek.

pro kůži *in vitro* (13). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (5).

Tabulka 1

Kategorie a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN [1]

Kategorie žíravých látek (kategorie 1) (pro orgány nepoužívající podkategorie)	Podkategorie potenciálně žíravých látek [1] (pro orgány používající podkategorie, včetně nařízení CLP)	Žíravá u ≥ 1 ze 3 zvířat	
		Expozice	Pozorované příznaky
Žíravá	Podkategorie žíravosti 1A	≤ 3 minuty	≤ 1 hodina
	Podkategorie žíravosti 1B	> 3 minuty / ≤ 1 hodina	≤ 14 dnů
	Podkategorie žíravosti 1C	> 1 hodina / ≤ 4 hodiny	≤ 14 dnů

[1] Pro EU používá nařízení CLP tři podkategorie látek s leptavými účinky na kůži 1A, 1B a 1C.

7. Omezení této validované referenční metody (7) spočívá v tom, že mnoho nežíravých chemických látek a některé žíravé chemické látky nemusí být vhodné pro zkoušení na základě výsledků úvodního testu kompatibility (viz odstavec 13). Vodné chemické látky s pH v rozsahu 4,5 až 8,5 často nejsou pro zkoušení vhodné; 85 % chemických látek zkoušených v tomto rozmezí pH však nemělo ve zkouškách na zvířatech leptavé účinky (7). Metoda s membránovou bariérou *in vitro* může být použita na zkoušení pevných látek (rozpustných nebo nerozpustných ve vodě), kapalin (vodných a nevodných) a emulzí. Zkoušené chemické látky nevyvolávající zjistitelnou změnu při testu kompatibility (tj. barevná změna v chemickém detekčním systému (CDS) validované referenční zkušební metody) však nemohou být testovány metodou s membránovou bariérou a je třeba je testovat pomocí jiných zkušebních metod.

PRINCIP ZKOUŠKY

8. Zkušební systém sestává ze dvou komponentů: syntetické makromolekulární biobariéry a chemického detekčního systému (CDS); tato zkušební metoda detekuje přes CDS poškození membránové bariéry způsobené žíravými zkoušenými chemickými látkami po aplikaci zkoušené chemické látky na povrch syntetické makromolekulární membránové bariéry (7), pravděpodobně stejným mechanismem (mechanismy) žíravosti, který působí na živou kůži.
9. Penetraci membránové bariéry (neboli proniknutí) lze měřit podle počtu zákroků nebo pomocí chemického detekčního systému, včetně změny barvy pH indikačního barviva či některé jiné vlastnosti indikačního roztoku pod bariérou.
10. Membránová bariéra by měla být stanovena jako validní, tj. relevantní a spolehlivá, pro zamýšlené použití. Zahrnuje to zajištění, aby byly různé přípravky shodné, pokud jde o bariérové vlastnosti, např. aby dokázaly zachovat bariéru proti nežíravým chemickým látkám a aby umožňovaly klasifikaci leptavých vlastností chemických látek do různých podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1). Klasifikace vychází z doby, která je potřebná k tomu, aby chemická látka pronikla přes membránovou bariéru do indikačního roztoku.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

11. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat metodu s membránovou bariérou *in vitro*, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 2. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (10)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 2

Vhodné látky ([1])

Látka ([2])	Číslo CAS	Třída chemických látek	Podkategorie GHS OSN *in vivo* ([3])	Podkategorie GHS OSN *in vitro* ([3])
Dihydrát fluoridu boritého	13 319-75-0 Org.	Anorganické kyseliny	1A	1A
Kyselina dusičná	7 697-37-2	Anorganické kyseliny	1A	1A
Chlorid fosforečný	10 026-13-8	Anorganické kyseliny	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Chloridy kyselin	1B	1B
Hydroxid sodný	1 310-73-2	Anorganické zásady	1B	1B
1-(2-aminoethyl) piperazin	140-31-8	Alifatické aminy	1B	1B
Benzensulfonylchlorid	98-09-9	Chloridy kyselin	1C	1C
N,N-dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniliny	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Alifatické aminy	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoly	NC	NC
Nonylakrylát	2 664-55-3	Akryláty/metha-kryláty	NC	NC
Hydrouhličitan sodný	144-55-8	Anorganické soli	NC	NC

([1]) Dvanáct látek uvedených výše obsahuje tři látky z každé ze tří podkategorií GHS OSN pro žíravé látky a tři nežíravé látky, které jsou běžně dostupné u komerčních dodavatelů, přičemž podkategorie GHS OSN vychází z výsledků kvalitního testování *in vivo*. Tyto látky jsou převzaty ze seznamu 40 referenčních látek, které jsou uvedeny v minimálním seznamu chemických látek určených pro prokázání přesnosti a spolehlivosti zkušebních metod, jež jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční zkušební metodě, a byly vybrány ze 163 referenčních chemických látek, které byly původně použity pro validaci referenční zkušební metody (Corrositex®) (7) (10) (14). Cílem tohoto výběru bylo zahrnout pokud možno chemické látky, které: byly charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé látky, žíravé látky přepravních obalových skupin I, II a III podle systému OSN), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat, byly charakteristické pro chemické třídy použité v průběhu validačního procesu, mají chemickou strukturu, která byla dobře definována, vyvolávaly ve validované referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky, vyvolávaly v referenční zkoušce *in vivo* definitivní výsledky, byly komerčně dostupné a nebyly spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu (14).

([2]) Látky zkoušené v čistém stavu nebo s čistotou ≥ 90 %.

([3]) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro podkategorie GHS OSN 1A, 1B, respektive 1C.

POSTUP

12. V dalších odstavcích jsou popsány složky a postupy zkušební metody využívající umělou membránovou bariéru na posouzení leptavosti (7) (15) a vycházející ze stávající validované referenční metody, tj. komerčně dostupného testu Corrositex®. Membránová bariéra a kompatibilní/indikační a kategorizační roztoky mohou být zhotoveny, připraveny nebo pořízeny komerčně, jako je tomu v případě validované referenční metody Corrositex®. Protokol vzorové zkušební metody pro validovanou referenční zkušební metodu je k dispozici (7). Zkoušení je třeba provádět při teplotě okolí (17–25 °C) a jednotlivé složky by měly splňovat tyto podmínky.

Zkouška kompatibility zkoušené chemické látky

13. Před provedením zkoušky s membránovou bariérou se provádí zkouška kompatibility za účelem stanovení, zda chemický detekční systém dokáže zkoušenou chemickou látku detekovat. Jestliže chemický detekční systém nedetekuje zkoušenou chemickou látku, není zkušební metoda využívající membránovou bariéru vhodná pro posouzení potenciálních leptavých účinků této konkrétní zkoušené chemické látky a je třeba použít jinou zkušební metodu. Chemický detekční systém a podmínky expozice použité pro zkoušku kompatibility by měly odrážet expozici při následné zkoušce s membránovou bariérou.

Zkouška časové kategorie zkoušené chemické látky

14. Pokud je to pro zkušební metodu vhodné, měla by být zkoušená chemická látka, která prošla zkouškou kompatibility, podrobena zkoušce časové kategorie, tj. screeningové zkoušce na rozlišení slabých a silných kyselin nebo zásad. Například ve validované referenční zkušební metodě se časová kategorizační zkouška používá na zjištění, který ze dvou časových rámců má být použit, a to podle toho, zda je detekována významná kyselá nebo zásaditá rezerva. Na stanovení žíravosti a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN by se měly použít dva různé limitní časové rámce, a to podle kyselé nebo zásadité rezervy zkoušené chemické látky.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S MEMBRÁNOVOU BARIÉROU

Membránová bariéra

15. Membránová bariéra sestává ze dvou komponentů: bílkovinného makromolekulárního vodného gelu a propustné nosné membrány. Bílkovinný gel by měl být nepropustný pro kapaliny a pevné látky, ale při naleptání by měl začít propouštět. Kompletně zhotovená membránová bariéra by měla být uchovávána za předem určených podmínek, které prokazatelně vylučují znehodnocení gelu, např. vysušení, mikrobiální růst, posun, prasknutí, které by mohlo degradovat jeho funkčnost. Je třeba stanovit přijatelnou dobu uchovávání a po jejím uplynutí přípravky s membránovou bariérou nepoužívat.

16. Propustná nosná membrána představuje mechanickou oporu pro bílkovinný gel v průběhu procesu vzniku gelu a expozice zkoušené chemické látce. Nosná membrána by měla zabránit průhybu nebo posunu gelu a měla by být dobře prostupná pro všechny zkoušené chemické látky.

17. Bílkovinový gel složený z bílkovin, např. keratinu, kolagenu nebo směsí bílkovin, který vytváří gelovou matrici, slouží jako cíl pro zkoušenou chemickou látku. Bílkovinový materiál se umístí na povrch nosné membrány a umožní se prostup do gelu, než se membránová bariéra umístí na indikační roztok. Bílkovinový gel by měl mít všude stejnou tloušťku a hustotu a neměly by v něm být žádné vzduchové bublinky ani vady, které by mohly ovlivnit jeho funkční neporušenost.

Chemický detekční systém (CDS)

18. Indikační roztok, což je stejný roztok, jaký se používá pro zkoušku kompatibility, by měl reagovat na přítomnost zkoušené chemické látky. Používá se pH indikační barvivo nebo kombinace barviv, *např.* kresolová červeň a methyloranž, které ukážou změnu barvy v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky. Systém měření může být vizuální nebo elektronický.

19. Je třeba posoudit relevantnost a spolehlivost detekčních systémů, které jsou vyvinuty pro detekci průchodu zkoušené chemické látky přes bariérovou membránu, aby bylo možné prokázat rozsah chemických látek, které lze detekovat, a kvantitativní limity detekce.

POSTUP ZKOUŠKY

Sestavení komponentů zkušební metody

20. Membránová bariéra se vloží do lavičky (nebo zkumavky) obsahující indikační roztok tak, aby byla nosná membrána úplně v kontaktu s indikačním roztokem a aby na ní nebyly žádné vzduchové bublinky. Je třeba dbát na to, aby bariéra nebyla porušena.

Aplikace zkoušené chemické látky

21. Na horní povrch membránové bariéry se pečlivě nanese a rovnoměrně rozprostře vhodné množství zkoušené chemické látky, např. 500 µl kapaliny nebo 500 mg jemně rozdrcené pevné látky (7). Pro každou zkoušenou chemickou látku a odpovídající kontroly se připraví vhodný počet replikátů, např. čtyři (7) (viz odstavce 23 až 25). Čas nanesení zkoušené chemické látky na membránovou bariéru se zaznamená. Aby bylo zajištěno přesné zaznamenání krátkých dob leptání, časy aplikace zkoušené chemické látky do lahviček s replikáty se rozloží.

Měření průniku přes membránovou bariéru

22. Každá lahvička se řádně sleduje a zaznamená se čas první změny indikačního roztoku, tj. průnik přes bariéru, a určí se doba, která uplynula mezi aplikací a průnikem přes membránovou bariéru.

Kontroly

23. U zkoušek, které zahrnují použití vehikula nebo rozpouštědla se zkoušenou chemickou látkou, by vehikulum nebo rozpouštědlo mělo být kompatibilní se systémem membránové bariéry, tj. nemělo by narušit neporušenost systému membránové bariéry a měnit leptavé účinky zkoušené chemické látky. V případě potřeby je třeba kontrolu s rozpouštědlem (nebo vehikulem) zkoušet souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby se prokázala kompatibilita rozpouštědla se systémem membránové bariéry.

24. Pozitivní (leptavé účinky) kontrolu se střední žíravostí, např. 110 ± 15 mg hydroxidu sodného (podkategorie žíravých látek 1B podle systému GHS OSN) (7), je třeba provádět souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby bylo možné posoudit, zda zkušební systém funguje přijatelným způsobem. Pro hodnocení relativního leptavého potenciálu žíravé zkoušené chemické látky může být užitečná druhá pozitivní kontrola s látkou ze stejné chemické třídy jako zkoušená chemická látka. Pozitivní kontrolu (kontroly) je třeba volit tak, aby byly její leptavé účinky střední (např. podkategorie 1B podle GHS OSN), aby bylo možné detekovat změny doby průniku, které by mohly být nepřijatelně delší nebo kratší než stanovená referenční hodnota, což by naznačovalo, že zkušební systém nefunguje správně. Pro tento účel jsou extrémně žíravé (podkategorie 1A podle GHS OSN) nebo nežíravé chemické látky jen málo vhodné. Žíravá chemická látka podkategorie 1B podle GHS OSN by umožňovala detekci příliš rychlé nebo příliš pomalé doby průniku. Pro pozitivní kontrolu by mohla být použita slabě žíravá látka (podkategorie 1C podle GHS OSN) pro měření schopnosti zkušební metody konzistentně rozlišovat mezi slabě žíravými a nežíravými chemickými látkami. Bez ohledu na použitý přístup by měl být přijatelný rozsah odezvy pozitivní kontroly stanoven podle dosavadního rozsahu dob průniku u použité pozitivní kontroly (kontrol), například střední hodnota ± 2–3 směrodatné odchylky. V každé studii by měla být přesná doba průniku stanovena pro pozitivní kontrolu tak, aby mohly být detekovány odchylky mimo přijatelný rozsah.

25. Jako další opatření pro kontrolu kvality za účelem prokázání funkčnosti membránové bariéry by měla být souběžně se zkoušenou chemickou látkou provedena také negativní (látka bez leptavých účinků) kontrola, např. 10 % kyselina citronová, 6 % kyselina propionová (7).

Kritéria přijatelnosti studie

26. Na predikci leptavých účinků zkoušené chemické látky se podle stanovených časových parametrů pro jednotlivé podkategorie leptavých účinků GHS OSN použije doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Aby mohla být studie považována za přijatelnou, měla by souběžná pozitivní kontrola ukázat očekávanou dobu průniku (např. pokud je jako pozitivní kontrola použit hydroxid sodný, je doba průniku 8–16 minut), souběžná negativní kontrola by neměla vykazovat leptavé účinky, a pokud je zařazena souběžná kontrola s rozpouštědlem, neměla by tato kontrola vykazovat leptavé účinky ani by neměla měnit potenciál žíravosti zkoušené chemické látky. Před rutinním používáním metody, která se řídí touto zkušební metodou, by laboratoře měly prokázat odbornou způsobilost při použití dvanácti látek doporučených v tabulce 2. U nových metod typu „mee-too“ vyvinutých podle této zkušební metody, které jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční metodě (14), by měly být použity předem definované standardy funkčnosti na prokázání spolehlivosti a přesnosti nové metody, než bude tato metoda použita pro zkoušení pro regulační účely (10).

Interpretace výsledků a klasifikace žíravosti zkoušených chemických látek

27. Pro klasifikaci zkoušené chemické látky do podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1), případně podle přepravních obalových skupin OSN (16) se používá doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Pro každou navrhovanou zkušební metodu jsou stanoveny hraniční časové hodnoty pro každou ze tří podkategorií žíravosti. Konečné rozhodnutí o hraničních časových hodnotách by mělo vzít v úvahu nutnost minimalizovat podhodnocenou klasifikaci rizika leptavých účinků (tj. falešně negativní výsledky). V současném pokynu pro zkoušení by měly být použity hraniční časové hodnoty testu Corrositex® uvedené v tabulce 3, neboť tento test představuje jedinou zkušební metodu, která v současnosti odpovídá pokynu pro zkoušení (7).

Tabulka 3

Predikční model Corrositex®

Střední doba průniku (min)		Predikce podle GHS OSN ([3])
Zkoušené chemické látky kategorie 1 ([1]) (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	Zkoušené chemické látky kategorie 2 ([2]) (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	
0–3 min	0–3 min	Žíravá doplňková podkategorie 1A
> 3 až 60 min	> 3 až 30 min	Žíravá doplňková podkategorie 1B
> 60 až 240 min	> 30 až 60 min	Žíravá doplňková podkategorie 1C
> 240 min	> 60 min	Nežíravá

([1]) Zkoušené chemické látky s vysokou kyselou/zásaditou rezervou (6)
([2]) Zkoušené chemické látky s nízkou kyselou/zásaditou rezervou (6)
([3]) Podkategorie 1A, 1B a 1C podle systému GHS OSN odpovídají obalovým skupinám OSN I, II, respektive III.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

28. Doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací a průnikem přes bariéru u zkoušené chemické látky a pozitivní kontroly (kontrol), se vykazuje ve formě tabulky jako údaje o jednotlivých replikátech a střední hodnoty ± směrodatné odchylky pro každou zkoušku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

29. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Model s membránovou bariérou in vitro a použitý protokol, včetně prokázané přesnosti a spolehlivosti

Zkušební podmínky:

— popis použitého zařízení a postupů přípravy,

— zdroj a složení použité membránové bariéry *in vitro*,

— složení a vlastnosti indikačního roztoku,

— metoda detekce,

— množství zkoušené chemické látky a kontrolní látky,

— počet opakování,

— popis a odůvodnění časové kategorizační zkoušky,

— způsob aplikace,

— doby pozorování,

— popis použitých hodnotících kritérií a klasifikačních kritérií,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení chemických látek pro prokázání způsobilosti.

Výsledky:

— jednotlivá nezpracovaná data z jednotlivých zkoušek a kontrolních vzorků pro každý replikát ve formě tabulky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).

(4) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupné na internetových stránkách: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupné na internetových stránkách: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Chemická látka: látka nebo směs.

Chemický detekční systém (CDS): vizuální nebo elektronický měřicí systém s indikačním roztokem, který reaguje na přítomnost zkoušené chemické látky, *např.* změnou indikačního barviva pH nebo kombinace barviv, jež ukáže barevnou změnu v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky, nebo jinými druhy chemické či elektrochemické reakce.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost" a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive"):: nežíravá.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam referenčních chemických látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a iii) srovnatelné hladiny spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních chemických 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 zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

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

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

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

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

B.66 ZKOUŠKY *IN VITRO* FORMOU STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE SLOUŽÍCÍ K DETEKCI AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 455 (2016). Pokyn č. 455 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku zkoušek *in vitro* formou stabilně transfekované transaktivace sloužící k detekci agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (analýzy ER TA). Skládá se z několika mechanisticky a funkčně podobných zkušebních metod zjišťování agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (tj. ERα a/nebo ERβ) a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných zkušebních metod podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tento pokyn vycházející z funkční způsobilosti, jsou:

   — analýza STTA (2) s využitím buněčné linie (h) ERα-HeLa-9903, a

   — analýza VM7Luc ER TA (3) s využitím buněčné linie ([1]) VM7Luc4E2, která převážně exprimuje hERα s určitým příspěvkem od hERββ(4)(5).

   Pro vývoj a validaci podobných analýz stejného rizika jsou k dispozici standardy funkčnosti (PS) (6)(7), které by se měly používat. Umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 455, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy; podobné analýzy však budou přidány až po přezkumu a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 455 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na transaktivaci estrogenových receptorů při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách dokumentu OECD o standardizovaných pokynech pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (8). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti. Analýzy ER transaktivace (TA) popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „*analýzy in vivo poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách*“. Tato zkušební metoda je pro analýzy transaktivace (TA) *in vitro* určené na zjištění agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (ER).

3. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (9)(10)(11). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému.

4. Analýzy TA *in vitro* vycházejí z přímé nebo nepřímé interakce látek se specifickým receptorem, který reguluje transkripci reportérového genového produktu. Tyto analýzy se široce používají na hodnocení genové exprese regulované specifickými jadernými receptory, jako jsou estrogenové receptory (12)(13)(14)(15)(16). Byly navrženy pro detekci estrogenní transaktivace regulované estrogenovým receptorem (17)(18)(19). Existují minimálně dva hlavní podtypy jaderných estrogenových receptorů, α a β, které jsou kódovány odlišnými geny. Příslušné bílkoviny mají různé biologické funkce i různou distribuci v tkáních a vazebnou afinitu ligandů (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jaderné ERα zprostředkovávají klasickou estrogenní odpověď (27)(28)(29)(30), a proto je většina modelů, které jsou v současnosti vyvíjeny na měření aktivace nebo inhibice estrogenových receptorů, specifická pro ERα. Analýzy se používají k určení chemických látek, které aktivují (nebo inhibují) estrogenové receptory po vazbě na ligandy, kdy se poté

komplex receptor–ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese proteinového markeru. V těchto analýzách mohou být použity různé odpovědi reportérových genů. V systémech na bázi luciferázy transformuje enzym luciferáza substrát luciferin na bioluminiscenční produkt, který může být kvantitativně změřen luminometrem. Mezi další příklady běžných reportérových genů patří fluorescenční protein a gen *LacZ*, který kóduje β-galaktosidázu, enzym, který dokáže transformovat bezbarvý substrát X-gal (5- bromo-4-chloro-indolyl-galaktopyranosid) na modrý produkt, který lze kvantifikovat pomocí spektrofotometru. Tyto reportérové geny lze rychle a levně vyhodnotit pomocí komerčně dostupných testů.

5. Validační studie analýz STTA a VM7Luc TA prokázaly svoji relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (3)(4)(5)(30). Standardy funkčnosti pro analýzy ER TA na bázi luminiscence využívající buněčné linie prsu jsou uvedeny v hodnotící zprávě výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *An* In Vitro *Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Tyto standardy funkčnosti byly upraveny, aby je bylo možné použít na analýzu STTA i analýzu VM7Luc TA (2).

6. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

Platnost a omezení analýz TA

7. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat mechanistické informace, které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se transaktivace indukované chemickou vazbou na estrogenové receptory v systému *in vitro*. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.

8. Transaktivace zprostředkovaná estrogenovými receptory se považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED), i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, ii) syntézy hormonů, iii) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, iv) distribuce hormonů do cílových tkání a v) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.

9. Tato zkušební metoda se zabývá schopností chemických látek aktivovat (tj. účinkovat jako agonisté) a také potlačovat (tj. účinkovat jako antagonisté) transkripci závislou na estrogenových receptorech. Některé chemické látky mohou v závislosti na druhu buněk vykazovat agonistické i antagonistické účinky a jsou známy jako selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Chemické látky, které jsou v těchto analýzách negativní, by před vyvozením závěru, že daná chemická látka se na receptor neváže, mohly být posouzeny v testu vazby na estrogenové receptory. Dále je pravděpodobné, že tyto analýzy budou informovat pouze o účinku původní molekuly, přičemž nelze zapomínat na omezenou metabolizační kapacitu buněčných systémů *in vitro*. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Zkušební metoda je nicméně teoreticky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek, UVCB a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení vícesložkové látky, UVCB nebo směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

10. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu na agonistické účinky 34 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, anebo uterotrofní analýzy 26 klasifikováno s určitostí jako agonisté ER a 8 negativně (2)(3)(18)(31) (32)(33)(34). V tabulce 2 uvedeny výsledky testu na antagonistické účinky 15 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek jsou na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, 4 klasifikovány s určitostí/pravděpodobností jako antagonisté ER a 10 negativně (2)(3)(18)(31). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1 a v tabulce 2, byla mezi oběma referenčními zkušebními metodami u klasifikace všech látek s výjimkou jedné (Mifepristone) 100 % shoda u analýz antagonistů, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako agonista/antagonista ER nebo negativně. Doplňkové informace o této skupině chemických látek i o dalších chemických látkách zkoušených v analýzách STTA a VM7Luc ER TA v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro zkoušku ERTA (6)(7), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

Tabulka 1

Přehled výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na agonistické účinky a klasifikovaných jako agonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay [1]			VM7Luc ER TA Assay [2]		Zdroj údajů pro klasifikaci [4]		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Jiné ER TA [c]	ER vazba	Uterotrofní
1	17ß-estradiol [a]	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol [a]	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17-alfa-ethinylestradiol [a]	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron [a]	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol [a]	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terc*-oktylfenol [a]	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin [a]	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay [1]			VM7Luc ER TA Assay [2]		Zdroj údajů pro klasifikaci [4]		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Jiné ER TA [c]	ER vazba	Uterotrofní
9	Atrazin [a]	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A [a]	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B [a]	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylfthalát [a]	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Kumestrol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzein [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylftalát	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay [1]			VM7Luc ER TA Assay [2]		Zdroj údajů pro klasifikaci [4]		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Jiné ER TA [c]	ER vazba	Uterotrofní
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Kepon [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Norethynodrel [a]	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-Methoxychlor [a]	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC_{50}) [b]	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital [a]	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay ([1])			VM7Luc ER TA Assay ([2])		Zdroj údajů pro klasifikaci ([4])		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} ([b]) (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Jiné ER TA ([c])	ER vazba	Uterotrofní
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; EC_{50} = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní; NT = nezkoušeno; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC_{50}) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

([a]) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako agonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (hodnotící zpráva ICCVAM VM7Luc ER TA, tabulka 4-1 (3)).

([b]) Maximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1×10^{-5} M (analýza STTA) a 1×10^{-3} M (analýza VM7Luc ER TA).

([c]) Číslo v závorce představuje výsledky zkoušky klasifikované jako pozitivní (POS) nebo negativní (NEG) z celého počtu citovaných studií.

([1]) Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity – Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (2).

([2]) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM o zkušební metodě LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metoda *in vitro* na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

([3]) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

([4]) Klasifikace agonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody na vazbu ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Poznámky: Ne každá analýza v rámci této zkušební metody měla stejná měření. V některých situacích nelze vypočítat hodnotu EC_{50}, protože není generována celá křivka dávka-účinek. Zatímco u analýzy STTA je hlavním měřítkem hodnota PC_{10}, mohou existovat i další příklady, kde PC_x poskytne užitečné informace.

Tabulka 2

Porovnání výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na antagonistické účinky a klasifikovaných jako antagonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka [a]	CASRN	Analýza ER STTA [1]		Analýza VM7Luc ER TA [2]		Kandidát na účinky ER STTA [4]	ICCVAM [5] Dohoda o klasifikaci	MeSH [6] Třída chemických látek	Třída produktu [7]
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} [b] (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} [b], [3] (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
2	Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	POS	žádná hodnota IC_{50}	POS	žádná hodnota IC_{50}	POS	PP	Polycyklická sloučenina	Laboratorní chemická látka, přírodní produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	mírně POS	NEG	Steroid	Léčivý přípravek
4	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt

	Látka [a]	CASRN	Analýza ER STTA [1]		Analýza VM7Luc ER TA [2]		Kandidát na účinky ER STTA [4]	ICCVAM [5] Dohoda o klasifikaci	MeSH [6] Třída chemických látek	Třída produktu [7]
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} [b] (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} [b], [3] (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
9	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nezkoušeno	PN	Heterocyklická sloučenina, pyrimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Léčivý přípravek, veterinární látka
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický meziprodukt

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])		Analýza VM7Luc ER TA ([2])		Kandidát na účinky ER STTA ([4])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Uhlovodík (cyklický)	Přírodní produkt

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC_{50} = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní; PP = pravděpodobně pozitivní.

([a]) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Maximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1×10^{-3} M (analýza STTA) a 1×10^{-5} M (analýza VM7Luc ER TA).

([1]) Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2).

([2]) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL®ER (VM7Luc ER TA): Metoda in vitro na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

([3]) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

([4]) ER STTA aktivita se předpokládá na základě hlášených účinků známých z dosavadních údajů CERI o testování vazby na ER receptor, uterotrofní analýzy a informací shromážděných z otevřených zdrojů literatury (2).

([5]) Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

SLOŽKY ANALÝZY ER TA

Zásadní složky zkoušky

11. Tato zkušební metoda se vztahuje na analýzy využívající stabilně transfekovaný nebo endogenní receptor ERα a stabilně transfekovanou reportérovou genovou konstrukci pod kontrolou jednoho nebo několika estrogenových responzivních elementů; mohou však být přítomny i jiné receptory, jako je ERβ. Jsou to zásadní složky analýzy.

Kontroly

12. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční standardy pro každou analýzu agonistů a antagonistů. Souběžné kontroly (negativní, rozpouštědlo a pozitivní) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1).

Standardní postupy kontroly kvality

13. Standardní postupy kontroly kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby bylo zajištěno, že buněčná linie zůstane stabilní i po opakovaných pasážích, nebudou v ní mykoplazmata (tj. nebude obsahovat bakteriální kontaminaci) a uchová si schopnost podávat očekávané odpovědi zprostředkované estrogenovými receptory v průběhu času. U buněčných linií je třeba dále zkontrolovat správnou identitu a další kontaminanty (např. houby, kvasinky a viry).

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

14. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy. Aby laboratoř prokázala svou odbornou způsobilost, měla by analyzovat 14 vhodných látek uvedených v tabulce 3 na agonistické účinky a 10 vhodných látek z tabulky 4 na antagonistické účinky. Toto vyzkoušení odborné způsobilosti rovněž potvrdí reakční schopnost zkušebního systému. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy ER TA (6). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s ER agonistickými nebo antagonistickými účinky, vykazují vhodný rozsah síly očekávané od ER agonistů/antagonistů (tj. silné až slabé) a zahrnují negativní kontroly. Zkoušení vhodných látek by mělo být alespoň dvakrát zopakováno, a to v různé dny. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl zopakovat každý technik, který se analýzy učí. Podle typu buňky se mohou některé z těchto vhodných látek chovat jako selektivní modulátory estrogenových receptorů a vykazovat agonistické i antagonistické účinky. Vhodné látky jsou však v tabulce 3 a 4 klasifikovány podle známé převažující aktivity, která by měla být použita při hodnocení odborné způsobilosti.

15. Pro prokázání funkčnosti a pro účely kontroly kvality by si měla každá laboratoř sestavovat historické databáze agonistů a antagonistů s údaji o referenčním standardu (např. 17β-estradiol a tamoxifen), chemických látkách pro pozitivní a negativní kontrolu a kontrolu rozpouštědla (např. DMSO). Na začátku by měla být databáze vytvořena z alespoň 10 nezávislých zkoušek na agonistické účinky (např. 17β-estradiol) a 10 nezávislých zkoušek na antagonistické účinky (např. tamoxifen). Dále se přidají výsledky z budoucích analýz těchto referenčních standardů a kontrol rozpouštědla, aby se databáze rozšířila a byla tak zajištěna konzistence a funkčnost bioanalýz prováděných v laboratoři v průběhu času.

Tabulka 3

Seznam (14) vhodných látek pro analýzu agonistických účinků ([8])

č. ([7])	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď ([1])	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH ([5])	Třída produktu ([6])
				Hodnota PC_{10} (M) ([2])	Hodnota PC_{50} (M) ([2])	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) ([3])	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ([4])		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} \times 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
12	17α-estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
11	4-*terc*-oktylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt

č. (7)	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď (1)	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH (5)	Třída produktu (6)
				Hodnota PC_{10} (M) (2)	Hodnota PC_{50} (M) (2)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) (4)		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt
3	Butylbenzylfthalát	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Kyselina karboxylová, ester, kyselina ftalová	Plastifikátor, průmyslová chemická látka
4	*p,p'*- Methoxychlor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (halogenovaný)	Léčivý přípravek, veterinární látka
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Léčivý přípravek, konzervant
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10} - 10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Léčivé přípravky

č. (7)	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď (1)	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH (5)	Třída produktu (6)
				Hodnota PC_{10} (M) (2)	Hodnota PC_{50} (M) (2)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) (3)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) (4)		
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyklická sloučenina	Léčivé přípravky
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, indol	Léčivý přípravek, veterinární látka

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); EC_{50} = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC_{50}) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

(1) Klasifikace jako pozitivní nebo negativní u ER agonistických účinků vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z empirických údajů a dalších informací získaných z citovaných studií zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity - Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (30).

(3) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

(4) Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-10 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

(5) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

(7) Z tabulky 1 (Seznam referenčních chemických látek (22) pro hodnocení přesnosti ER agonistů) standardů funkčnosti (6).

(8) Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací a srovnatelnou sílou, způsobem účinku a ze stejné chemické třídy.

Tabulka 4

Seznam (10) vhodných látek pro analýzu antagonistů

	Látka [a]	CASRN	Analýza ER STTA [1]			Analýza VM7Luc ER TA [2]			Kandidát na účinky ER STTA [1]	ICCVAM [5] Dohoda o klasifikaci	MeSH [6] Třída chemických látek	Třída produktu [7]
			ER TA aktivita	IC_{50} (M)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	ER TA aktivita	IC_{50} [3] (M)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) [4]				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
2	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10}–10^{-5}	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	negativní (*)	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt
6	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor

	Látka [a]	CASRN	Analýza ER STTA [1]			Analýza VM7Luc ER TA [2]			Kandidát na účinky ER STTA [1]	ICCVAM [5] Dohoda o klasifikaci	MeSH [6] Třída chemických látek	Třída produktu [7]
			ER TA aktivita	IC_{50} (M)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	ER TA aktivita	IC_{50} [3] (M)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) [4]				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	negativní (*)	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	negativní (*)	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	negativní (a)	NEG	Uhlovodík (cyklický)	Přírodní produkt

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC_{50} = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní.

(*) klasifikováno negativně podle kontroly literatury (2).

(a) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

(1) Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2)

(2) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): Metoda in vitro na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

(3) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

(4) Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-11 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

(5) Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

(6) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), což je mezinárodně uznávaná standardizovaná klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(7) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

16. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční standardy a kontroly použité pro každý experiment. Hodnoty pro PC_{50} (EC_{50}) nebo IC_{50} pro referenční standardy by měly splňovat kritéria přijatelnosti stanovená pro zvolenou analýzu (pro STTA viz dodatek 2, pro VM7Luc ER TA viz dodatek 3) a všechny pozitivní/negativní kontroly by měly být pro každý přijatý experiment správně klasifikovány. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčních standardů a kontrol (viz odstavec 15). Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčních standardů z vícečetných experimentů. Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

— Údaje by měly být dostačující pro kvantitativní posouzení aktivace (u analýzy agonistů) nebo suprese (u analýzy antagonistů) ER (tj. účinnost a síla).

— Střední aktivita reportérových genů pro referenční koncentraci referenčního estrogenu by měla dosahovat alespoň minima stanoveného v analýzách týkajících se aktivity kontroly s vehikulem (rozpouštědlem), aby byla zajištěna adekvátní citlivost. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je to čtyřnásobek střední kontroly s vehikulem na každé destičce.

— Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušených chemických látek a neměly by vykazovat cytotoxicitu.

Analýza údajů

17. Pro klasifikaci pozitivní a negativní odpovědi by měl být použit definovaný postup interpretace údajů pro každou analýzu.

18. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 16) ukazuje, že analýza funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány reprodukovatelné výsledky (např. výsledky z obou provedení ukazují, že zkoušená chemická látka je pozitivní), není nutné provádět zkoušku potřetí.

19. Jestliže dvě provedení zkoušky nepodají reprodukovatelné výsledky (např. zkoušená chemikálie je při jednom provedení pozitivní a při druhém provedení negativní) nebo jestliže je potřebný větší stupeň jistoty, pokud jde o výsledek této analýzy, je třeba provést alespoň tři nezávislé zkoušky. V takovém případě vychází klasifikace ze dvou shodných výsledků ze tří.

Obecná kritéria interpretace údajů

20. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů ER TA. Kvalitativní (např. pozitivní/negativní) anebo kvantitativní (např. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) posouzení aktivity zprostředkované estrogenovými receptory by však mělo vycházet z empirických údajů a fundovaného vědeckého úsudku. Pokud je to možné, měly by být pozitivní výsledky charakterizovány jak intenzitou účinku v porovnání s kontrolou vehikulem (rozpouštědlem) nebo referenčním estrogenem, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází (např. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} atd.).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

21. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

— použitá analýza,

— kontrola / referenční standard / zkoušená chemická látka,

— zdroj, číslo šarže a datum použitelnosti, je-li k dispozici,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy.

Buňky:

— typ a zdroj buněk:

  • Je ER endogenně exprimován? Pokud není, které receptory byly transfekovány?

  • použitá (použité) reportérová (reportérové) konstrukce (včetně zdrojových druhů),

  • metoda transfekce,

  • selekční metoda pro udržení stabilní transfekce (ve vhodných případech),

  • je metoda transfekce relevantní pro stabilní linie?

— počet pasáží (z rozmrazených buněk),

— číslo pasáže buněk při rozmrazení,

— metody udržování buněčných kultur.

Zkušební podmínky:

— omezení rozpustnosti,

— popis použitých metod posuzování životaschopnosti,

— složení média, koncentrace CO_2,

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— objem vehikula a přidané zkoušené chemické látky,

— inkubační teplota a vlhkost,

— trvání expozice,

— hustota buněk na začátku expozice a během expozice,

— pozitivní a negativní referenční standardy,

— reportérové reagencie (název přípravku, dodavatel a šarže),

— kritéria klasifikace jednotlivých provedení zkoušky na pozitivní, negativní nebo neurčitou.

Kontrola přijatelnosti:

— násobné indukce pro každou destičku, a zda splňují minimum požadované pro analýzu na základě dosavadních kontrol,

— skutečné hodnoty pro kritéria přijatelnosti, např. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční standardy.

Výsledky:

— nezpracovaná a normalizovaná data,

— maximální úroveň násobku indukce,

— údaje o cytotoxicitě,

— pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),

— hodnoty RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} a/nebo EC_{50} podle potřeby,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95 % CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): s. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): s. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): s. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): s. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): s. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al*. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): s. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al*. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al*. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al*. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al*. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al*. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro, In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al*. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. Chem. 13, 67-82.

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

Agonista: Látka, která vyvolá odpověď, např. transkripci, když se naváže na specifický receptor.

Antagonista: Druh receptorového ligandu nebo chemická látka, která sama nevyvolává biologickou odpověď po navázání na receptor, ale blokuje nebo tlumí odpovědi zprostředkované agonisty.

Antiestrogenní aktivita: je schopnost chemické látky potlačit působení 17β-estradiolu zprostředkované přes estrogenové receptory.

Buněčná morfologie: Tvar a vzhled buněk rostoucích v monovrstvě v jedné jamce destičky pro tkáňové kultury. Buňky, které odumírají, často vykazují abnormální buněčnou morfologii.

CF: Koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních distruptorů.

Ošetření aktivním uhlím/dextranem: Ošetření séra použitého v buněčné kultuře. Ošetření aktivním uhlím/dextranem (často označované jako „stripping") odstraňuje endogenní hormony a bílkoviny, na které se hormony vážou.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Cytotoxicita: Škodlivé účinky pro buněčnou strukturu nebo funkci, které mohou nakonec způsobit buněčnou smrt a vyvolat snížení počtu buněk přítomných v jamce na konci doby expozice nebo snížení kapacity pro měření buněčné funkce při porovnání se souběžnou kontrolou vehikulem.

CV: Variační koeficient.

DCC-FBS: Fetální bovinní sérum ošetřené aktivním uhlím, které je potaženo dextranem.

DMEM: Dulbeccova modifikace Eaglova média.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

E2: 17β-estradiol.

EC50: Poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hERα: Lidský estrogenní receptor alfa.

hERß: Lidský estrogenní receptor beta.

EFM: Médium bez estrogenů Dulbeccova modifikace Eaglova média (DMEM) doplněná 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu.

ER: Estrogenový receptor.

ERE: Estrogen responzivní element.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17β-estradiolu vázat se na estrogenové receptury a aktivovat je. Touto zkušební metodou lze detekovat estrogenní aktivitu zprostředkovanou hERα.

ERTA: Transaktivace estrogenových receptorů.

FBS: Fetální bovinní sérum.

HeLa: Imortalizovaná buněčná linie z lidského děložního hrdla.

HeLa9903: Subklon buněk HeLa, do nichž byly stabilně transfekovány hERααa reportérový gen luciferázy.

IC_{50}: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře“ (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která vyvolává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

MT: Metallothionein.

MMTV: Virus myšího nádoru prsní žlázy.

OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

PC: (pozitivní kontrola): Silně aktivní látka, nejlépe 17ß-estradiol, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

PC_{10}: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 10 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při 1nM pro analýzu STTA) na každé destičce.

PC_{50}: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 50 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při referenční koncentraci stanovené ve zkušební metodě) na každé destičce.

PC_{Max}: Koncentrace zkoušené chemické látky vyvolávající RPC_{Max}.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované analýze, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor ze seznamu referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované zkušební metody. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen (pozitivní kontrola, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční standard: Referenční látka použitá na prokázání vhodnosti analýzy. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je referenčním standardem 17β-estradiol.

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 455.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

RLU: Relativní luminiscenční jednotky.

RNA: Kyselina ribonukleová.

RPC_{Max}: Maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako % odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce.

RPMI: Médium RPMI 1 640 doplněné 0,9 % Pen-Strepu a 8,0 % fetálního bovinního séra (FBS).

Provedení zkoušky: Individuální experiment, kterým se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy. Každé provedení představuje úplný experiment provedený v replikovaných jamkách s buňkami kultivovanými ze stejného zdroje buněk ve stejném čase.

Nezávislé provedení zkoušky: Samostatný nezávislý experiment, při němž se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy s použitím buněk z jiného zdroje, čerstvě naředěných chemických látek, provedený v jiné dny nebo ve stejný den jiným pracovníkem.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních látek, které jsou na základě analýzy správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Stabilní transfekce: Když je do kultivovaných buněk transfekována DNA takovým způsobem, aby byla stabilně intregrována do genomu buněk, čímž dojde ke stabilní expresi transfekovaných genů. Klony stabilně transfekovaných buněk se selektují stabilními markery (např. resistence na G418).

Analýza STTA: Analýza stabilně transfekované transaktivace, analýza transkripční aktivace ERα s využitím buněčné linie HeLa 9 903.

Studie: Experimentální práce v plném rozsahu provedená za účelem hodnocení jedné specifické látky s využitím specifické analýzy. Studie zahrnuje všechny kroky včetně testů ředění zkoušené látky ve zkušebním médiu, předběžné zkoušky ke stanovení rozsahu, všechny nezbytné komplexní zkoušky, analýzy údajů, zajištění kvality, posouzení cytotoxicity atd. Provedení studie umožňuje klasifikovat aktivitu zkoušené chemické látky z hlediska toxicity (tj. účinná, neúčinná nebo neprůkazná), což se hodnotí použitou analýzou a odhadem síly ve vztahu k pozitivní referenční chemické látce.

Látka: Podle nařízení REACH ([1]) je látka definována jako chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem, včetně všech přídatných látek nezbytných k uchování jeho stability a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, avšak s vyloučením všech rozpouštědel, která lze oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení. Velmi podobná definice se používá v rámci GHS OSN (1).

TA (transaktivace):: Iniciace syntézy mRNA v reakci na specifický chemický signál, jako je navázání estrogenu na estrogenový receptor.

Analýza: V souvislosti s touto zkušební metodou je analýza jednou z metodik, která je uznávána jako validní z hlediska plnění stanovených kritérií výkonnosti. Složky analýzy zahrnují například specifickou buněčnou linii se souvisejícími růstovými podmínkami, specifické médium, v němž je zkouška prováděna, podmínky uspořádání destiček, sestavu a ředění zkoušených chemických látek společně s dalšími požadovanými opatřeními v oblasti kontroly kvality a související kroky při hodnocení údajů.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Transkripce: Syntéza mRNA.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Analýza, 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 (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

VC (kontrola s vehikulem): Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky a kontrolních chemických látek a zkouší se výhradně jako vehikulum bez rozpuštěné chemické látky.

VM7: Imortalizovaná buňka adenokarcinomu, která endogenně exprimuje estrogenový receptor.

VM7Luc4E2: Buněčná linie VM7Luc4E2 byla odvozena z imortalizovaných buněk získaných z lidského adenokarcinomu VM7, které endogenně exprimují obě formy estrogenového receptoru (ERα a ERβ) a jsou stabilně transfekovány plasmidem pGudLuc7.ERE. Tento plasmid obsahuje čtyři kopie syntetického oligonukleotidu obsahujícího estrogen responzivní element před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy a genu luciferázy světlušek.

Slabá pozitivní kontrola: Slabě aktivní látka vybraná ze seznamu referenčních chemických látek, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Úř. věst. L 304, 22.11.2007, s. 1).

Dodatek 2

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOVÝCH AGONISTICKÝCH A ANTAGONISTICKÝCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH LÁTEK S POUŽITÍM BUNĚČNÉ LINIE HERA-HELA-9903

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této transaktivační analýze (TA) se používá buněčná linie hERα-HeLa-9 903 na detekci estrogenní agonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα). Validační studie analýzy stabilně transfekované transaktivace (STTA) provedená japonským Ústavem pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) s použitím buněčné linie hERα-HeLa-9 903 na detekci estrogenových agonistických a antagonistických účinků zprostředkovaných lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα) prokázala relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel (1).

2. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hERα měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μM však byly hlášeny luminiscenční signály nezprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (2) (3). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (dodatek 1).

3. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 2.1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

4. Analýza se používá na signalizaci vazby ligandu na estrogenový receptor. Po vazbě na ligandy se komplex receptor-ligand přesune do jádra, kde se naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Luciferin je substrát, který enzym luciferáza transformuje na bioluminiscenční produkt, jenž může být kvantitativně změřen luminometrem. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů.

5. Zkušební systém používá buněčnou linii hERα-HeLa-9 903, která je odvozena z lidského tumoru děložního hrdla, se dvěma stabilně vloženými konstrukcemi: (i) konstrukcí pro expresi hERαα (kódující lidský receptor v celé délce) a (ii) reportérovou konstrukcí luciferázy světlušek nesoucí pět tandemových repeticí vitelogeninového estrogen-responzivního elementu (ERE) řízeného myším methalothioneinovým (MT) promotorem TATA elementu. Prokázalo se, že myší genová konstrukce MT TATA podává nejlepší výkon, a proto se běžně používá. Proto může tato buněčná linie hERα-HeLa-9 903 měřit schopnost testované chemické látky indukovat hERα-zprostředkovanou transaktivaci exprese luciferázového genu.

6. V případě analýzy ER agonistů vychází interpretace údajů z toho, zda je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou rovná nebo vyšší než odpověď agonisty rovnající se 10 % odpovědi indukované maximálně indukující (1 nM) koncentrací pozitivní kontroly (PC) 17β-estradiol (E2) (tj. PC10). V případě analýzy ER antagonistů vychází interpretace údajů z toho, zda odpověď vykazuje alespoň 30 % snížení aktivity oproti odpovědi indukované obohacenou kontrolou (25 pM E2) bez cytotoxicity. Analýza a interpretace údajů je podrobně probrána v odstavcích 34–48.

POSTUP

Buněčné linie

7. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie hERα-HeLa-9 903. Buněčnou linii lze získat z buněčné banky Japonské sbírky výzkumných biozdrojů (*Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB) [1] po podpisu smlouvy o prodeji materiálu.

8. Při zkoušení by měly být používány pouze buňky charakterizované jako buňky bez mykoplazmat. Metodou volby pro citlivou detekci mykoplazmové infekce je RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (4)(5)(6).

Stabilita buněčné linie

9. Pro monitorování stability buněčné linie by se jako referenční standardy pro analýzu agonistů měly používat E2, 17α-estradiol, 17α-methyltestosteron a kortikosteron a alespoň jednou je třeba při každém provedení analýzy změřit kompletní křivku závislosti odpovědi na koncentraci v rozsahu zkoušených koncentrací uvedených v tabulce 1, přičemž výsledky by měly být v souladu s výsledky uvedenými v tabulce 1.

10. V případě analýzy antagonistů je třeba změřit současně s každým provedením zkoušky úplné křivky koncentrace pro dva referenční standardy, tamoxifen a flutamid. U obou chemických látek je třeba sledovat správnou kvalitativní klasifikaci na pozitivní nebo negativní.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

11. Buňky se udržují v Eaglově minimálním esenciálním médiu (EMEM) bez fenolové červeně, doplněném 60 mg/l antibiotika kanamycinu a 10 % fetálního bovinního séra ošetřeného aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (DCC-FBS) v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2) při 37±1 °C. Po dosažení 75–90 % konfluence mohou být buňky pasážovány s 10 ml 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 buněk/ml pro 100 mm nádobu s buněčnou kulturou. Buňky by měly být suspendovány s 10 % FBS-EMEM (což je stejné médium jako EMEM s DCC-FBS) a poté umístěny do jamek mikrotitrační destičky v hustotě 1 x 104 jamek/(100 µl x jamka). Dále by měly být buňky předběžně inkubovány v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37 °±1 °C po dobu 3 hodin před expozicí chemické látce. Plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogenní aktivitu.

12. Aby se zachovala integrita odpovědi, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v upraveném médiu a neměly by být kultivovány déle než 40 pasáží. Pro buněčnou linii hERα-HeLa-9 903 to bude méně než tři měsíce. Výkonnost buněk však může být snížena, pokud jsou kultivovány v nevhodných podmínkách.

13. Médium DCC-FBS lze připravit podle popisu v dodatku 2.2 nebo pořídit z komerčních zdrojů.

Kritéria přijatelnosti

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu agonistů ER

14. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací silného estrogenu: E2, slabého estrogenu (17α-estradiol), velmi slabého agonisty (17α-methyltestosteron) a negativní látky (kortikosteron). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto 4 souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií přijatelnosti (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a antibiotik) a analýzu zopakovat. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50}, PC_{50} a PC_{10} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro

[1] JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonsko Fax: +81-72-641-9812.

kultivaci buněk. Čtyři souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy, protože hodnoty PC_{10} tří pozitivních referenčních standardů by měly spadat do přijatelného rozsahu, stejně jako hodnoty PC_{50} a EC_{50}, pokud je lze vypočítat (viz tabulka 1).

Tabulka 1

Rozsah přijatelných hodnot čtyř referenčních standardů pro analýzu agonistů ER

Název	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillův koeficient	Zkušební rozsah
17β-estradiol (E2) CAS č.: 50-28-2	−11,4 ~ −10,1	< −11	−11,3 ~ −10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8}M
17α-estradiol CAS č.: 57-91-0	−9,6 ~ −8,1	−10,7 ~ −9,3	−9,6 ~ −8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6}M
Kortikosteron CAS č.: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-methyltestosteron CAS č.: 58-18-4	−6,0 ~ −5,1	−8,0 ~ −6,2	–	–	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu antagonistů ER

15. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací pozitivní látky (tamoxifen) a negativní látky (flutamid). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 2. Tyto dva souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly být správně posouzeny, jak je uvedeno v kritériích. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a antibiotik) a analýzu zopakovat. Dále by měly být vypočítány hodnoty IC_{50} pro pozitivní látku (tamoxifen) a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro kultivaci buněk. Dva souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy (viz tabulka 2).

Tabulka 2

Kritéria a rozsah přijatelných hodnot dvou referenčních standardů pro analýzu antagonistů ER

Název	Kritéria	$logIC_{50}$	Zkušební rozsah
Tamoxifen CAS č.: 10 540-29-1	Pozitivní: IC50 nemohla být vypočtena	-–5,942 ~ −7,596	10^{-10} ~ 10^{-5}M
Flutamid CAS č.: 13 311-84-7	Negativní: IC30 nemohla být vypočtena	-	10^{-10} ~ 10^{-5}M

Pozitivní a negativní kontroly

16. Pozitivní kontrola (PC) pro analýzu agonistů ER (1 nM E2) a pro analýzu antagonistů ER (10μM TAM) by měla být testována na každé destičce alespoň třikrát. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky, by mělo být testováno jako kontrola vehikula (VC) na každé destičce alespoň třikrát. Kromě této kontroly vehikula by měla být kontrola vehikula provedena na stejné destičce alespoň třikrát se stejnou pozitivní kontrolou, pokud se u pozitivní kontroly používá jiné vehikulum než u zkoušené chemické látky.

Kvalitativní kritéria pro analýzu agonistů ER

17. Střední aktivita luciferázy u pozitivní kontroly (1 nM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie (historicky mezi čtyřnásobkem a třicetinásobkem).

18. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být násobná indukce odpovídající hodnotě PC_{10} souběžné pozitivní kontroly (1 nM E2) větší než 1+2SD hodnoty násobné indukce (=1) souběžné kontroly vehikula. Za účelem stanovení priorit může být hodnota PC_{10} užitečná pro zjednodušení analýzy dat potřebné na porovnání se statistickou analýzou. Ačkoli statistická analýza poskytuje informace o významnosti, tato analýza není kvantitativním parametrem, pokud jde o potenciál vycházející z koncentrace, a proto je méně užitečná pro účely stanovení priorit.

Kvalitativní kritéria pro analýzu antagonistů ER

19. Střední aktivita luciferázy u obohacené kontroly (25 pM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie.

20. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být relativní transkripční aktivace (RTA) 1 nM E2 větší než 100 %, RTA 1μM 4-hydroxytamoxifenu (OHT) by měla být menší než 40,6 % a RTA 100 μM Digitoninu (Dig) by měla být menší než 0 %.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody).

Vehikulum

21. Jako souběžná kontrola vehikula by měl být použit dimethylsulfoxid (DMSO) nebo vhodné rozpouštědlo ve stejné koncentraci použité pro různé pozitivní a negativní kontroly a zkoušené chemické látky. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které danou zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 0,1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy.

Příprava zkoušených chemických látek

22. Obecně je třeba zkoušené chemické látky rozpustit v DMSO nebo jiném vhodném rozpouštědle, postupně naředit stejným rozpouštědlem ve společném poměru 1:10, a připravit tak roztoky pro ředění médiem.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozsahu

23. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit vhodný rozsah koncentrace chemické látky, jež má být testována, a zkontrolovat, zda zkoušená chemická látka nevykazuje nějaké problémy v oblasti rozpustnosti a cytotoxicity. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 μl/ml, 1 mg/ml, nebo 1 mM podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší. Podle rozsahu cytotoxicity nebo nerozpustnosti pozorované při předběžné zkoušce by se chemická látka měla při prvním definitivním provedení zkoušky testovat v log-sériovém ředění, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM, 100μM, 10μM atd.) a měla by se zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny či cytotoxicity. Při druhém a v případě potřeby i třetím provedení zkoušky by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci a aby byly vyloučeny koncentrace, které byly zjištěny jako nerozpustné nebo vyvolávající nadměrnou cytotoxicitu.

24. U agonistů a antagonistů ER může přítomnost zvyšujících se úrovní cytotoxicity významně změnit nebo eliminovat typickou sigmoidní odpověď, což je třeba vzít v úvahu při interpretaci dat. Měly by se používat metody zkoušení cytotoxicity, které mohou poskytnout informace o 80 % životaschopnosti buněk, s využitím vhodné analýzy na základě zkušeností laboratoře.

25. Pokud výsledky zkoušky cytotoxicity ukazují, že koncentrace zkoušené chemické látky snížila počet buněk o 20 % nebo více, je třeba tuto koncentraci považovat za cytotoxickou a koncentrace na cytotoxické úrovni nebo vyšší je třeba z hodnocení vyloučit.

Expozice chemické látce a organizace testovacích destiček

26. Postup ředění chemických látek (kroky 1 a 2) a expozici buněk (krok 3) lze provést takto:

Krok 1: Každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupně naředit v DMSO nebo vhodném rozpouštědle a přidat do jamek mikrotitrační destičky, aby byla dosažena finální sériová koncentrace stanovená při předběžné zkoušce ke stanovení rozsahu (obvykle v sérii například 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM a 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)) pro trojí testování.

Krok 2: Ředění chemické látky: Nejprve rozpusťte 1,5 μl zkoušené chemické látky v rozpouštědle na objem 500 μl média.

Krok 3: Expozice buněk chemické látce: Přidejte 50 μl roztoku s médiem (připraveného v kroku 2) do testovací jamky obsahující 10^4 buněk/100 μl/ jamku.

Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 150 μl. Zkušební vzorky a referenční standardy lze zařadit tak, jak je uvedeno v tabulce 3 a v tabulce 4.

Tabulka 3

Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	17α-methyltestosteron			Kortikosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1 % DMSO); PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

27. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (E2, 17α-estradiol, 17-methyltestosteron a kortikosteronmm(tabulka 3)((Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky PC exponované 1 nM E2, který dokáže vyvolat maximální indukci E2, a jamky VC exponované pouze DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem) (tabulka 4). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

Tabulka 4

Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1 % DMSO); Pozitivní kontrola: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

Tabulka 5

Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Tamoxifen			Flutamid			Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola:(1 nM E2), OHT :4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

= obohaceno 25pM E2

28. Aby mohla být posouzena antagonistická aktivita chemických látek, je třeba jamky umístěné v řadách A až G obohatit 25pM E2. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (tamoxifen a flutamid). Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky s PC exponované 1 nM E2, který může být použit jako kontrola kvality buněčné linie hERα-HeLa-9 903, jamky s VC exponované DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem), jamky s 0,1 % DMSO exponované přídavkem DMSO do obohaceného E2 odpovídající „obohacené kontrole", jamky exponované finální koncentrací 1 μM OHT a jamky exponované 100 μM Dig (tabulka 5). Další testovací destička by měla mít stejné uspořádání bez buněk s referenčními standardy (tabulka 6). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

Tabulka 6

Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

: obohaceno 25pM E2

29. Podle potřeby je třeba potvrdit nepřítomnost okrajových účinků, a pokud je podezření na takové účinky, je třeba uspořádání destičky změnit, aby k nim nedocházelo. Může být například použito uspořádání destičky s vyloučením okrajových jamek.

30. Po přidání chemických látek by testovací destičky měly být inkubovány v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37 °±1 °C po dobu 20–24 hodin, aby se indukovaly reportérové genové produkty.

31. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé. V těchto případech mohou vedlejší kontrolní jamky generovat falešně pozitivní výsledky, což je třeba vzít v úvahu s ohledem na očekávané a dosavadní kontrolní hodnoty. V ojedinělých případech, kdy může být těkavost problémem, může pomoci použití „zapečetěných destiček" účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je v těchto případech doporučováno.

32. Opakované definitivní testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost.

Luciferázová analýza

33. Pro analýzu může být použito komerční luciferázové činidlo [např. systém Steady-Glo® Luciferase Assay (Promega, E2510 nebo ekvivalentní)] nebo standardní luciferázový systém (např. Promega, E1500 nebo ekvivalentní), pokud jsou splněna kritéria přijatelnosti. Činidla pro analýzu je třeba zvolit podle citlivosti luminometru, který bude použit. Když se používá standardní luciferázový systém, mělo by být před přidáním substrátu použito lyzační činidlo na buněčnou kulturu (např. Promega, E1531 nebo ekvivalentní). Luciferázové činidlo je třeba aplikovat podle pokynů výrobce.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Analýza agonistů ER

34. Aby byla získána relativní transkripční aktivita u PC (1 nM E2), mohou být v případě analýzy agonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

Krok 2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou PC.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované PC (PC = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí PC.

Krok 5. Vypočtěte střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou skupinu koncentrace zkoušené chemické látky. Odpověď má dva rozměry: zprůměrovaná transkripční aktivita (odpověď) a koncentrace, při níž dochází k odpovědi (viz následující část).

Poznámky k indukci EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}

35. Pro výpočet EC_{50} je nutná celá křivka závislosti koncentrace na odpovědi, ale to nemusí být vždy dosažitelné nebo praktické vzhledem k mezím rozsahu zkušebních koncentrací (například v důsledku problémů s cytotoxicitou nebo rozpustností). Protože jsou však EC_{50} a maximální indukční úroveň (odpovídající horní hodnotě Hillovy rovnice) informativními parametry, měly by být tyto parametry pokud možno uvedeny. Pro výpočet EC_{50} a maximální indukční úrovně by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism). Jestliže lze na údaje o koncentraci a odpovědi aplikovat Hillovu logistickou rovnici, je třeba vypočítat EC_{50} takto (7):

Y= dolní + (horní–dolní) / (1+10 exp ((log EC_{50}–X) x Hillův koeficient)) Kde:

X je logaritmus koncentrace; a

Y je odpověď, přičemž Y začíná na dolní hranici a pokračuje nahoru sigmoidní křivkou. Dolní hranice je v Hillově logistické rovnici pevně stanovena na nule.

36. Pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být zajištěny tyto podmínky:

RPC_{Max}, což je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako procento odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce, stejně jako PC_{Max} (koncentrace související s RPC_{Max}); a

u pozitivních chemických látek koncentrace, které indukují PC_{10}, případně PC_{50}.

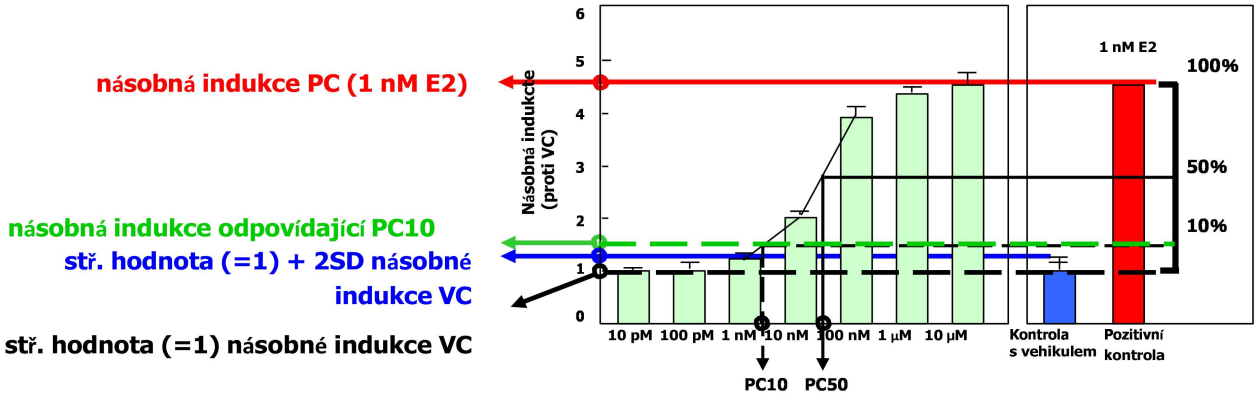
37. Hodnotu PCx lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou PCx. Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou PCx souřadnice (a,b), respektive (c,d), pak lze vypočítat hodnotu PCx podle této rovnice:

log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

38. Popisy hodnot PC jsou uvedeny níže na obrázku 1.

Obrázek 1

Příklad odvození hodnot PC. Na každé testovací destičce je zařazena PC (1 nM E2)



Analýza antagonistů ER

39. Aby byla získána relativní transkripční aktivita (RTA) u obohacené kontroly (25 pM E2), mohou být v případě analýzy antagonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

Krok 2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data. Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou obohacenou kontrolu.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované obohacené kontroly (obohacená kontrola = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí obohacené kontroly.

Krok 5. Vypočtěte střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou expozici.

Poznámky k indukci IC_{30} a IC_{50}

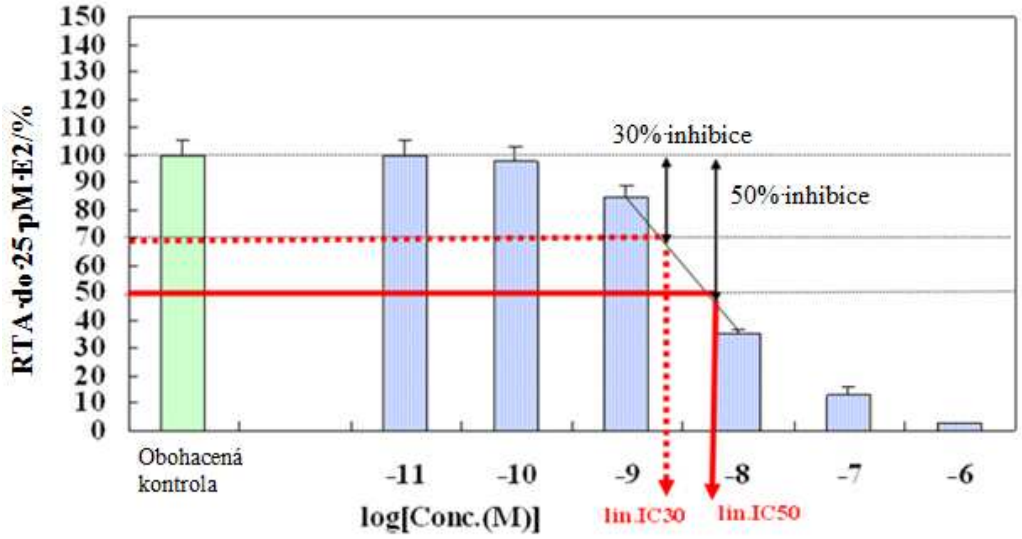
40. U pozitivních chemických látek je třeba uvést koncentrace, které indukují IC_{30}, případně IC_{50}.

41. Hodnotu ICx lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou ICx. Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou ICx souřadnice (c,d), respektive (a,b), pak lze vypočítat hodnotu ICx podle této rovnice:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Obrázek 2

Příklad odvození hodnot IC. Na každé testovací destičce je zařazena obohacená kontrola (25 nM E2)



RTA: relativní transkripční aktivita

42. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

— splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti v odstavcích 14–20),

— být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

Tabulka 7

Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze agonistů ER

Pozitivní	Jestliže je získána RPC_{Max}, která se rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi pozitivní kontroly alespoň dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže RPC

Tabulka 8

Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze antagonistů ER

Pozitivní	Jestliže je vypočtena IC_{30} alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže IC_{30} není vypočtena alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

43. Kritéria interpretace údajů jsou uvedena v tabulkách 7 a 8. Pozitivní výsledky budou charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Oba tyto cíle splňuje vyjádření výsledků jako koncentrace, při níž je u analýzy agonistů dosaženo 50 % (PC50) nebo 10 % (PC10) hodnot PC a u analýzy antagonistů je 50 % (IC50) nebo 30 % (IC30) hodnoty obohacené kontroly inhibováno. Zkoušená chemická látka je však určena jako pozitivní, jestliže se maximální odpověď indukovaná touto zkoušenou chemickou látkou (RPC_{Max}) rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi PC alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek, zatímco za negativní je zkoušená chemická látka považována, jestliže RPC_{Max} nedosáhne alespoň 10 % odpovědi pozitivní kontroly ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

44. Výpočty PC_{10}, PC_{50} a PC_{Max} v analýze agonistů ER a IC_{30} a IC_{50} v analýze antagonistů ER mohou být provedeny pomocí tabulkového kalkulátoru, který je dostupný u příslušného pokynu na veřejných webových stránkách OECD ([2]).

45. Získání hodnot PC_{10} nebo PC_{50} a IC_{30} nebo IC_{50} alespoň dvakrát by mělo stačit. Pokud však výsledná výchozí hodnota pro data ve stejném rozsahu koncentrace vykazují variabilitu s nepřijatelně vysokým variačním koeficientem (CV; %), nelze tato data považovat za spolehlivá a je třeba najít zdroj vysoké variability. Variační koeficient prvních tří opakování (tj. údaje o intenzitě luminiscence) datových bodů, které jsou použity pro výpočet PC_{10}, by měl být menší než 20 %.

46. Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že analytický systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.

47. V případě analýzy agonistů ER, kdy jsou potřebné další informace kromě informací pro účely screeningu a stanovení priorit tohoto pokynu pro pozitivní zkoušené chemické látky, zvláště pro chemické látky PC_{10}–PC_{49}, jakož i chemické látky, u nichž existuje podezření, že nadměrně stimulují luciferázu, může být potvrzeno, že pozorovaná aktivita luciferázy je výhradně ERα-specifická odpověď pomocí antagonisty ERα (viz dodatek 2.1).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al*. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Dodatek 2.1

FALEŠNĚ POZITIVNÍ: POSOUZENÍ LUMINISCENČNÍCH SIGNÁLŮ NEZPROSTŘEDKOVANÝCH RECEPTOREM

1. Falešně pozitivní výsledky mohou být při analýze agonistů ER generovány aktivací luciferázového genu nezprostředkovanou ER nebo přímou aktivací genového produktu či nesouvisející fluorescencí. Tyto účinky indikuje neúplná nebo neobvyklá křivka závislosti odpovědi na dávce. V případě podezření na tyto účinky je třeba vyšetřit účinek antagonisty ER (např. 4-hydroxytamoxifen (OHT) při netoxické koncentraci) na odpověď. K tomuto účelu nemusí být vhodný čistý antagonista ICI 1827 80, neboť dostatečná koncentrace ICI 1827 80 může snížit hodnotu VC, což ovlivní analýzu dat.

2. Aby byla zajištěna validita tohoto přístupu, je třeba na stejné destičce otestovat:

   — agonistickou aktivitu neznámé chemické látky s/bez 10 μM OHT

   — VC (tři opakování)

   — OHT (tři opakování)

   — 1 nM E2 (tři opakování) jako agonistická PC

   — 1 nM E2 + OHT (tři opakování)

KRITÉRIA INTERPRETACE ÚDAJŮ

Poznámka: Do všech jamek by měla být aplikována stejná koncentrace vehikula.

— Jestliže aplikace antagonisty ER NEOVLIVNÍ agonistickou aktivitu neznámé chemické látky, klasifikuje se jako „negativní“.

— Jestliže je agonistická aktivita neznámé chemické látky zcela inhibována, použijte kritéria rozhodování.

— Jestliže se agonistická aktivita při nejnižší koncentraci rovná nebo je vyšší než odpověď PC_{10}, je neznámá chemická látka inhibována při odpovědi rovnající se nebo vyšší než PC_{10}. Vypočte se rozdíl odpovědí mezi jamkami neošetřenými a ošetřenými antagonistou ER a jamkami, do nichž antagonista ER byl aplikován, a tento rozdíl je třeba považovat za skutečnou odpověď a použít jej pro výpočet vhodných parametrů, aby mohlo být rozhodnuto o klasifikaci.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Zkontrolujte standard funkčnosti.

Zkontrolujte variační koeficient mezi jamkami ošetřenými za stejných podmínek.

1. Vypočítejte střední hodnotu VC.

2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky **neošetřené** OHT.

3. Vypočítejte střední hodnotu OHT.

4. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky ošetřené OHT.

5. Vypočítejte střední hodnotu PC.

6. Vypočítejte relativní transkripční aktivitu všech ostatních jamek ve vztahu k PC.

Dodatek 2.2

PŘÍPRAVA SÉRA OŠETŘENÉHO AKTIVNÍM UHLÍM POTAŽENÝM DEXTRANEM (DCC)

1. Ošetření séra aktivním uhlím potaženým dextranem (DCC) je obecná metoda na odstranění estrogenních sloučenin ze séra, které se přidává do kultivačního média, aby se vyloučila zkreslená odpověď související s reziduálními estrogeny v séru. Tímto postupem lze ošetřit 500 ml fetálního bovinního séra (FBS).

SLOŽKY

2. Potřebné budou tyto materiály a vybavení:

Materiály

Aktivní uhlí

Dextran

Hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sacharóza

1 M HEPES pufrační roztok (pH 7,4)

Ultračistá voda z filtračního systému

Vybavení

Sterilizovaná skleněná nádoba (velikost podle potřeby) běžná laboratorní odstředivka (s možností nastavení teploty na 4 °C)

POSTUP

3. Při použití 50ml odstředivkových zkumavek se upraví tento postup:

[Den 1] Připravte suspenzi aktivního uhlí potaženého dextranem s 1 litrem ultračisté vody obsahující 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharózy, 2,5 g aktivního uhlí, 0,25 g dextranu a 5 mM HEPES a nechte promíchávat přes noc při 4 °C.

[Den 2] Nadávkujte suspenzi do 50ml odstředivkových zkumavek a odstřeďujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Odstraňte supernatant a uložte polovinu sedimentu aktivního uhlí při 4 °C pro použití 3. den. Druhou polovinu aktivního uhlí rozpusťte v FBS, které jste nechali pomalu roztát, aby nevznikla sraženina, a inaktivovali teplem při teplotě 56 °C po dobu 30 minut, poté přemístěte do sterilizované nádoby, například Erlenmeyerovy baňky. Tuto suspenzi nechte lehce promíchávat přes noc při teplotě 4 °C.

[Den 3] Nadávkujte suspenzi s FBS do odstředivkových zkumavek a odstřeďujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Seberte FBS a uložte jej do nového sedimentu aktivního uhlí připraveného a uloženého 2. den. Rozpusťte sediment aktivního uhlí a tuto suspenzi nechte přes noc lehce promíchávat ve sterilizované nádobě při teplotě 4 °C.

[Den 4] Nadávkujte suspenzi k odstřeďování při 10 000 ot./min. při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a sterilizujte supernatant filtrací přes sterilní filtr 0,2 μm. Tento FBS ošetřený DCC by měl být uchováván při teplotě −20 °C a může být používán po dobu jednoho roku.

Dodatek 3

ANALÝZA TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ VM7LUC KE ZJIŠTĚNÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této analýze se používá buněčná linie VM7Luc4E2 ([1]). Byla validována Meziagenturním střediskem pro hodnocení alternativních toxikologických metod Národního toxikologického programu (*National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* – NICEATM) a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* – ICCVAM) (1). Buněčné linie VM7Luc exprimují převážně endogenní ERα a menší množství endogenního ERβ (2) (3) (4).

2. Tuto analýzu lze použít u široké škály látek, pokud mohou být rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; CASRN 67-68-5), nereagují s DMSO ani s kultivačním médiem a nejsou cytotoxické ve zkoušených koncentracích. Pokud není možné použít DMSO, může být použito jiné vehikulum, jako je etanol nebo voda (viz odstavec 12). Prokázaná funkční způsobilost analýzy (ant)agonistů VM7Luc ER TA naznačuje, že údaje získané při této analýze mohou poskytnout informace o mechanismech působení zprostředkovaných ER a mohou být vzaty v úvahu při určování priorit látek k dalšímu zkoušení.

3. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hERα a hERß měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití chemiluminiscence při bioanalýzách je rozšířené, protože luminiscence má vysoký poměr odstupu signálu od pozadí. Aktivitu luciferázy světlušek v buněčných testech však mohou zkreslovat látky, které inhibující enzym luciferázu, a vyvolávají tak zdánlivou inhibici nebo vyšší luminiscenci v důsledku stabilizace proteinů. Kromě toho v některých analýzách reportérového genu ER na bázi luciferázy byly při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μM hlášeny luminiscenční signály nezprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (9) (11). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Analýza se používá na indikaci vazby ligandu na estrogenový receptor, po níž následuje přesun komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen (*luc*), což vyvolá tvorbu luciferázy a následnou emisi světla, které lze kvantifikovat pomocí luminometru. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů. Test VM7Luc ER TA využívá ER responzivní buněčnou linii lidského adenokarcinomu prsu, VM7, která je stabilně transfekována reportérovou konstrukcí světlušek *luc* pod kontrolou čtyř estrogenových responzivních elementů umístěných před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy (MMTV), k detekci látek s agonistickou nebo antagonistickou aktivitou

([1]) Do června 2016 byla tato buněčná linie označována za buněčnou linii BG1Luc. Buňky BG-1 původně popsal Geisinger et al. (1998) (12) a později je charakterizovali výzkumníci v Národním ústavu věd o zdravém životním prostředí (NIEHS) (13). Relativně nedávno bylo objeveno, že existují dvě různé varianty buněk BG-1, které používají výzkumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Hloubková analýza zahrnující testování DNA těchto dvou variantních buněčných linií BG-1, kterou provedl Li a spolupracovníci (2014) (14), ukázala, že buněčná linie BG-1 Fr je jedinečná a že buněčná linie BG-1 NIEHS, tj. původní buněčná linie použitá při vývoji analýzy, není buněčná linie lidského karcinomu vaječníku BG1, ale že jde o variantu buněčné linie lidského karcinomu prsu MCF7. Buněčná linie použitá při analýze, původně nazývaná BG1Luc4E2 (15), se bude nyní označovat jako VM7Luc4E2 („V“ = variantní; „M7“ = buňky MCF7). Podobně se bude analýza nyní označovat jako VM7Luc ER TA. I když se mění původ buněčné linie, z níž analýza vychází, nejsou tím dotčeny publikované validační studie ani využitelnost a použití této analýzy pro screening estrogenních/antiestrogenních chemických látek.

ER *in vitro*. Tento promotor MMTV vykazuje jen malou křížovou reaktivitu s jinými steroidními a nesteroidními hormony (8). Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 41. Stručně řečeno, pozitivní odpověď se určuje podle křivky závislosti odpovědi na koncentraci obsahující alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota ± SD) a podle změny amplitudy (normalizovaná relativní luminiscenční jednotka [RLU]) ve výši alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard (17β-estradiol [E2; CASRN 50-28-2] při analýze agonistů, raloxifen-hydrochlorid [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 při analýze antagonistů).

POSTUP

Buněčná linie

6. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie VM7Luc4E2. Tato buněčná linie je v současnosti k dispozici pouze na základě technické licenční smlouvy od Kalifornské univerzity, Davis, Kalifornie, USA ([2]) a společnosti Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([3]).

Stabilita buněčné linie

7. Aby se zachovala stabilita a integrita buněčné linie, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v udržovacím médiu (viz odstavec 9). Buňky by neměly být kultivovány déle než 30 pasáží. Pro buněčnou linii VM7Luc4E2 bude 30 pasáží trvat zhruba tři měsíce.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

8. Měly být dodržovány postupy uvedené v pokynu ke správné praxi při kultivaci buněk (5)(6), aby byla zajištěna kvalita všech materiálů a metod a zachována integrita, validita a reprodukovatelnost veškeré provedené práce.

9. Buňky VM7Luc4E2 se uchovávají v médiu RPMI 1 640 doplněném 0,9 % přípravkem Pen-Strep a 8,0 % fetálním bovinním sérem (FBS) v inkubátoru vyhrazeném pro tkáňové kultury při teplotě 37 °C ± 1 °C, vlhkosti vzduchu 90 % ± 5 % a 5,0 % ± 1 % CO_2/vzduch.

10. Po dosažení konfluence ~ 80 % se buňky VM7Luc4E2 subkultivují a po dobu 48 hodin upravují v prostředí bez estrogenů, než jsou umístěny na 96jamkovou mikrotitrační destičku, kde jsou exponovány zkoušenými chemickými látkami a analyzovány na indukci luciferázové aktivity závislé na estrogenu. Médium bez estrogenů (EFM) obsahuje Dulbeccovu modifikaci Eaglova média bez fenolové červeně (DMEM), doplněného 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu. Žádné plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogenní aktivitu [viz podrobný protokol (7)].

Kritéria přijatelnosti

11. Přijetí nebo odmítnutí zkoušky vychází z hodnocení referenčního standardu a kontrolních výsledků z každého experimentu na 96jamkové destičce. Každý referenční standard se zkouší v několika koncentracích a na několika vzorcích každé referenční i kontrolní koncentrace. Výsledky se porovnají s kvalitativními kontrolami (QC) u těch parametrů,

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404 Org.

které byly odvozeny z dosavadních databází agonistů a antagonistů, které si každá laboratoř vypracovala při prokazování způsobilosti. Dosavadní databáze se průběžně aktualizují o hodnoty referenčních standardů a kontrol. Při změnách vybavení nebo podmínek v laboratoři může být nutná aktualizace dosavadních databází.

Zkouška agonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Indukce: Indukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinásobná indukce, ale pro účely přijetí by měla být indukce větší než nebo rovna čtyřnásobku.

- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU rozpouštědla by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.

- Experiment, při němž není splněno ani jedno kritérium, je třeba vyřadit a zopakovat.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu agonistů a tyto údaje:

- Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.

- Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU methoxychloru by měly být větší než střední hodnota DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty DMSO.

- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, je třeba vyřadit a zopakovat.

Zkouška antagonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Redukce: Redukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinásobná redukce, ale pro účely přijetí by měla být redukce větší než nebo rovna trojnásobku.

- Výsledky kontroly E2: Kontrolní hodnoty RLU E2 by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU E2.

- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU DMSO by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.

• Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu antagonistů a tyto údaje:

• Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu Ral/E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.

• Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU tamoxifenu/E2 by měly být menší než kontrolní střední hodnota E2 minus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty E2.

• Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Referenční standardy, pozitivní kontrola a kontrola vehikula

Kontrola vehikula (analýzy agonistů a antagonistů)

12. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s vehikulem. Vehikulem použitým při validaci analýzy VM7Luc ER TA byl 1 % (obj.) dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (viz odstavec 24). Jestliže je použito jiné vehikulum než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány podle potřeby ve stejném vehikulu.

Referenční standardy (zjištění rozsahu agonistů)

13. Referenčním standardem je E2 (CASRN 50-28-2). Při zkouškách ke stanovení rozsahu sestává referenční standard z postupného ředění čtyř koncentrací E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} a 2,87 x 10^{-12} M), přičemž každá koncentrace se zkouší v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (souhrnný test agonistů)

14. E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění 1: 2 a zahrnuje 11 koncentrací (v rozsahu od 3,67 x 10^{-10} do 3,59 x 10^{-13} M) E2 v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (zjištění rozsahu antagonistů)

15. Referenčním standardem je kombinace Ral (CASRN 84 449-90-1) a E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pro zkoušky ke stanovení rozsahu sestává z postupného ředění tří koncentrací Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} a 1,92 x 10^{-10}M) plus fixní koncentrace E2 (9,18 × 10^{-11} M) v duplikátních jamkách.

Referenční standard (souhrnný test antagonistů)

16. Ral/E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění Ral 1: 2 (v rozsahu od 2,45x 10^{-8} do 9,57 x 10^{-11}M) plus fixní koncentrace (9,18 × 10^{-11} M) E2 zahrnujícího devět koncentrací Ral/E2 v duplikátních jamkách.

Slabá pozitivní kontrola (agonista)

17. Slabá pozitivní kontrola je 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor; CASRN 72-43-5) v EFM.

Slabá pozitivní kontrola (antagonista)

18. Slabá pozitivní kontrola sestává z tamoxifenu (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M s 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM.

Kontrola E2 (pouze analýza antagonistů)

19. Kontrola E2 je 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM a používá se jako výchozí negativní kontrola.

Násobná indukce (agonista)

20. Indukce luciferázové aktivity referenčního standardu (E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO, přičemž výsledek by měl být větší než čtyřnásobek.

Násobná indukce (antagonista)

21. Střední luciferázová aktivita referenčního standardu (Ral/E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO a měla by být větší než trojnásobek.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

22. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy. Referenční standardy a kontroly se rozpustí ve 100 % rozpouštědle a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM.

Příprava zkoušených chemických látek

23. Zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100 % DMSO (nebo vhodném rozpouštědle) a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM. Před rozpuštěním a naředěním by se měly všechny zkoušené chemické látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. Pro každý experiment by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. V roztocích by neměla být znatelná žádná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně; pro každý experiment by však měly být připraveny čerstvé konečné referenční standardní a kontrolní roztoky a zkoušené chemické látky a měly by být použity do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozmezí dávek

24. Zkoušky ke stanovení rozsahu zahrnují sedmibodové postupné ředění – 1:10 a provádějí se dvakrát. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 mg/ml (~1 mM) u zkoušek agonistů a 20 μg/ml (~10 μM) u zkoušek antagonistů. Experimenty ke stanovení rozsahu se používají k určení:

— počátečních koncentrací zkoušené chemické látky, jež mají být použity při souhrnném testování,

— ředění zkoušených chemických látek (1: 2 nebo 1: 5), jež mají být použity při souhrnném testování.

25. Posouzení životaschopnosti buněk/cytotoxicity je zahrnuto v protokolech o zkouškách agonistů a antagonistů (7) a je součástí zkoušek ke stanovení rozsahu a souhrnného testování. Metodou posouzení cytotoxicity, která byla použita pro posouzení životaschopnosti buněk při validaci analýzy VM7Luc ER TA (1), byla škálovaná kvalitativní vizuální observační metoda; ke stanovení cytotoxicity však může být použita kvantitativní metoda (viz protokol (7). Údaje z koncentrací zkoušených chemických látek, které vyvolávají více než 20 % redukci životaschopnosti, nelze použít.

Expozice zkoušené chemické látce a organizace testovacích destiček

26. Buňky se spočítají a umístí na 96jamkové mikrotitrační destičky (2×10^5 buněk na jamku) v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 24 hodin, aby se umožnilo přichycení buněk na destičku. EFM se odstraní a nahradí zkoušenými a referenčními chemickými látkami v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 19–24 hodin. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé, neboť vedlejší kontrolní jamky mohou generovat falešně pozitivní výsledky. V těchto případech může pomoci použití „zapečetěných destiček" účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je doporučováno.

Zkoušky ke stanovení rozsahu

27. *Při zkouškách* ke stanovení rozsahu se používají všechny jamky 96jamkové mikrotitrační destičky na testování až šesti zkoušených chemických látek v sedmibodovém postupném ředění 1:10 duplicitně (viz obrázky 1 a 2).

— *Při zkouškách* ke stanovení rozsahu *agonistů* se používají čtyři koncentrace E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO.

— Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používají tři koncentrace Ral/E2 s $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 duplicitně jako referenční standard a tři replikované jamky pro kontrolu E2 a DMSO.

Obrázek 1

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Zkratky: E2-1 až E2-4 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Obrázek 2

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-3 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Všechny zkoušené chemické látky jsou testovány v přítomnosti 9,18 × 10-11 M E2.28.
Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 200 µl. Používejte pouze testovací destičky, v nichž buňky ve všech jamkách vykazují životaschopnost 80 % a více.

29. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování ***agonistů*** je podrobně popsáno v protokolu pro agonisty (7). Stručně řečeno, použijí se tato kritéria:

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1: 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, měla by být počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování o jeden logaritmus vyšší než koncentrace vykazující nejvyšší upravenou hodnotu RLU ve zkoušce ke zjištění rozsahu. 11bodové ředění vychází z ředění 1: 2 nebo 1: 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1: 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak používejte ředění 1: 5.

— Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje při zkoušce ke zjištění rozsahu dvoufázovou křivku závislosti odpovědi na koncentraci, měly by být při souhrnném testování vyřešeny také obě fáze.

30. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování ***antagonistů*** je podrobně popsáno v protokolu pro antagonisty (7). Stručně, použijí se tato kritéria:

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1: 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, měla by počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování, odpovídat jedné z těchto možností:

• Koncentrace vykazující při zkoušce ke zjištění rozsahu nejnižší upravenou hodnotou RLU

• Maximální rozpustná koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-2)

• Nejnižší cytotoxická koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-3, kde je uveden podobný příklad).

— 11bodové ředění vychází z postupného ředění 1: 2 nebo 1: 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1: 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak se použije ředění 1: 5.

Souhrnné testování

31. Souhrnné testování sestává z jedenáctibodového postupného ředění (postupné ředění buď 1: 2, nebo 1: 5 na základě počáteční koncentrace pro kritéria souhrnného testování), přičemž každá koncentrace se testuje ve třech jamkách 96jamkové mikrotitrační destičky (viz obrázky 3 a 4).

— Při souhrnném testování *agonistů* se používá 11 koncentrací E2 duplicitně jako referenční standard. Na každé destičce jsou zahrnuty čtyři replikované jamky pro kontrolu s DMSO a čtyři replikované jamky pro kontrolu s methoxychlorem (9,06 x 10^{-6} M).

— Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používá devět koncentrací Ral/E2 s 9,18 × 10^{-11} M E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu E2 9,18 x 10^{-11} M, čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO a čtyři replikované jamky pro tamoxifen 3,36 x 10^{-6} M.

Obrázek 3

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Zkratky: TC1-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1; TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2; E2-1 až E2-11 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Meth = p,p' methoxychlor slabá pozitivní kontrola; VC = DMSO (1 % obj.) EFM kontrola vehikula

Obrázek 4

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-9 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Tam = tamoxifen/E2 slabá pozitivní kontrola; TC1-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Jak bylo uvedeno, všechny referenční a testovací jamky obsahují pevně stanovenou koncentraci E2 (9,18 x 10^{-11} M).

32. Opakované souhrnné testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost. Měly by být provedeny nejméně dva souhrnné testy. Jestliže jsou výsledky testů vzájemně rozporné (například jeden test je pozitivní, druhý negativní) nebo jestliže jeden z testů není adekvátní, měl by být proveden dodatečný třetí test.

Měření luminiscence

33. Luminiscence se měří v rozsahu 300 až 650 nm, a to pomocí injekčního luminometru a softwaru, který řídí objem vstřikování a interval měření (7). Světelné emise z každé jamky se vyjadřují jako RLU na jamku.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Stanovení EC_{50} /IC_{50}

34. Hodnota EC_{50} (poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky [agonisté]) a hodnota IC_{50} (poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky [antagonisté]) se stanoví z údajů o závislosti odpovědi na koncentraci. U zkoušených chemických látek, které jsou pozitivní při jedné nebo několika koncentracích, se koncentrace zkoušené chemické látky, která vyvolává poloviční maximální odpověď (IC_{50} nebo EC_{50}) vypočítá pomocí analýzy Hillovy funkce nebo vhodným alternativním způsobem. Hillova funkce je čtyřparametrový logistický matematický model týkající se závislosti odpovědi na koncentraci zkoušené chemické látky (obvykle podle sigmoidní křivky) s využitím níže uvedené rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

kde:

Y= odpověď (tj. RLU);

X= logaritmus koncentrace;

Bottom= minimální odpověď;

Top= maximální odpověď;

log EC_{50} (nebo log IC_{50})= logaritmus X jako odpověď uprostřed mezi maximální a minimální;

Hillův koeficient= sklon křivky.

Model počítá nejlépe odpovídající hodnoty pro parametry maximální odpovědi, minimální odpovědi, sklon křivky a IC_{50} a EC_{50}. Pro výpočet hodnot EC_{50} a IC_{50} by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism®).

Stanovení odlehlých hodnot

35. Správné statistické posouzení by mohlo být usnadněno zařazením (například) Q-testu (viz protokoly pro agonisty a antagonisty (7) pro stanovení „nepoužitelných" jamek, které budou vyřazeny z analýzy dat.

36. U referenčních standardních replikátů E2 (velikost vzorku dva) se každá upravená hodnota RLU pro replikáty při dané koncentraci E2 považuje za odlehlou hodnotu, jestliže je více než 20 % nad nebo pod upravenou hodnotou RLU pro tuto koncentraci v dosavadní databázi.

Sběr a korekce dat z luminometru pro testování ke stanovení rozsahu

37. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro kontrolu s vehikulem DMSO (VC).

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC_{50} pro zkoušené chemické látky.

Antagonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední násobnou redukci pro referenční standard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.

Krok 5 Vypočítejte střední hodnotu IC_{50} pro zkoušené chemické látky.

Sběr a korekce dat z luminometru pro souhrnné testování

38. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC_{50} pro E2 a zkoušené chemické látky.

Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro methoxychlor.

Antagonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední násobnou indukci pro referenční standard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu IC_{50} pro Ral/E2 a zkoušené chemické látky.

Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro tamoxifen.

Krok 6 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.

Kritéria interpretace údajů

39. Analýza VM7Luc ER TA je součástí přístupu založeného na průkazných důkazech a má pomoci stanovit priority u látek pro zkoušení ED *in vivo*. Součásti tohoto postupu stanovení priorit bude klasifikace zkoušené chemické látky jako pozitivní nebo negativní pro ER agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. Pozitivní a negativní rozhodovací kritéria použitá ve validační studii analýzy VM7Luc ER TA jsou popsána v tabulce 1.

Tabulka 1

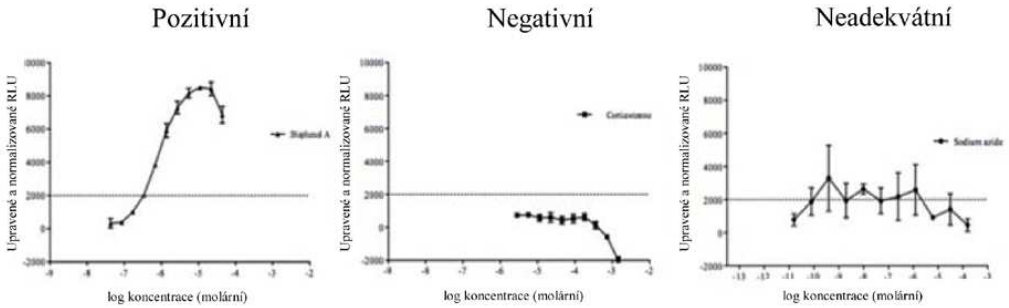
Pozitivní a negativní kritéria rozhodování

AGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	— Všechny zkoušené chemické látky klasifikované jako *pozitivní* u ER agonistické aktivity by měly mít křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje pozitivní sklon a křivku ukončuje plató nebo vrchol. V některých případech mohou být definovány pouze dvě z těchto charakteristik (výchozí hodnota – sklon nebo sklon – vrchol). — Přímka definující pozitivní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota ± SD). Body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat vrchol prvního bodu plató. — Pozitivní klasifikace vyžaduje amplitudu odpovědi, rozdíl mezi výchozí hodnotou a vrcholem, alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard, E2 (tj. 2 000 RLU nebo více, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [E2] upravena na 10 000 RLU). — Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota EC_{50}.
Negativní	Průměrná upravená hodnota RLU pro danou koncentraci je na nebo pod střední hodnotou RLU kontroly DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky hodnoty RLU DMSO.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemické látky je třeba otestovat znovu.
ANTAGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	— Data zkoušené chemické látky vytvářejí křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje negativní sklon. — Přímka definující negativní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami; body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat první bod plató. — Mělo by zde být alespoň 20 % snížení aktivity oproti maximální hodnotě pro referenční standard, Ral/E2 (tj. 8 000 RLU nebo méně, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [Ral/E2] upravena na 10 000 RLU). — Nejvyšší necytotoxické koncentrace zkoušené chemické látky by měly být menší než nebo rovny 1×10^{-5} M. — Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota IC_{50}.
Negativní	Všechny datové body nad hodnotou EC_{80} (80 % odpovědi E2, nebo 8 000 RLU) při koncentracích menších než $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemickou látku je třeba otestovat znovu.

40. Pozitivní výsledky budou pokud možno charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Příklady pozitivních, negativních a neadekvátních dat jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6.

Obrázek 5

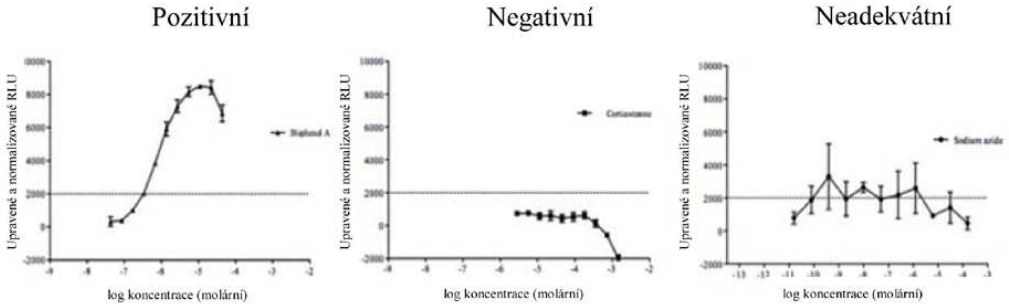
Příklady agonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 20 % odpovědi E2, 2 000 upravených a normalizovaných RLU.

Obrázek 6

Příklady antagonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 80 % odpovědi Ral/E2, 8 000 upravených a normalizovaných RLU.

Plná čára označuje 1,00 × 10-5 M. Aby byla odpověď považována za pozitivní, měla by být pod čarou 8 000 RLU, a to při koncentracích menších než 1,00 × 10-5M.

Koncentrace označené hvězdičkou na grafu meso-hexestrolu označují skóre životaschopnosti „2“ nebo větší.

Výsledky zkoušek u meso-hexestrolu se považuji za neadekvátní data, protože jediná odpověď, která je pod 8 000 RLU, se vyskytuje při 1,00 × 10-5M.

41. Výpočty EC50 a IC50 lze provést pomocí čtyřparametrové Hillovy funkce (viz protokol pro agonisty a protokol pro antagonisty, kde jsou uvedeny podrobnější informace (7)). Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že byly získány přesné údaje (viz odstavec 19„SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

42. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.(1)

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. Chem. 13, 67-82.

Dodatek 4

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOV'YCH AGONISTICK'YCH A ANTAGONISTICK'YCH ÏΘINKΩ CHEMICK'YCH LATEK S POUITNM BUNMΘNI LINIE ERA CALUX

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při transaktivační analýze ERα CALUX se používá buněčná linie U2OS na detekci estrogenní agonistické a antagonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα). Relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel prokázala validační studie biotestu stabilně transfekovaného ERα CALUX od společnosti BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemsko) (1). Buněčná linie ERα CALUX exprimuje pouze stabilně transfekovaný lidský ERα (2)(3).

2. Tato analýza je specificky určena k detekci transaktivace zprostředkované hERα měřením bioluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití bioluminiscence je v biotestech běžné vzhledem k vysokému poměru signálu k šumu (4).

3. Bylo hlášeno, že koncentrace fytoestrogenů vyšší než 1 μM nadměrně aktivují reportérový gen luciferázy, přičemž výsledkem je luminiscence nezprostředkovaná receptorem (5)(6)(7). Proto je třeba vyšší koncentrace fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, které mohou nadměrně aktivovat expresi luciferázy, pečlivě prozkoumat v analýzách stabilně transfekované transaktivace ER (viz dodatek 2).

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD" a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA". Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Biotest se používá k posouzení vazby ligandu na estrogenový receptor a následného přesunu komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Po přidání substrátu luciferázy luciferinu se luciferin transformuje na bioluminiscenční produkt. Vzniklé světlo lze snadno detekovat a kvantifikovat pomocí luminometru.

6. Zkušební systém využívá stabilně transfekované buňky ERα CALUX. Buňky ERα CALUX pocházejí z buněčné linie lidského osteoblastického osteosarkomu U2OS. Lidské buňky U2OS byly stabilně transfekovány 3xHRE-TATA-Luc a pSG5-neo-hERα pomocí koprecipitace s využitím fosforečnanu vápenatého. Buněčná linie U2OS byla vybrána jako nejlepší kandidát na estrogen- (a jiný steroidní hormon) responzivní reportérovou buněčnou linii na základě pozorování, že buněčná linie U2OS vykazovala jen malou nebo žádnou endogenní receptorovou aktivitu. Absence endogenních receptorů byla hodnocena pouze pomocí luciferázových reportérových plazmidů, kdy po přidání ligandů pro receptory nebyla vykázána žádná aktivita. Navíc tato buněčná linie podporovala silné, hormonem zprostředkované odpovědi, když byly přechodně vneseny příbuzné receptory (2)(3)(8).

7. Testování chemických látek na estrogenní nebo antiestrogenní aktivitu pomocí buněčné linie ERα CALUX zahrnuje předběžnou screeningovou zkoušku a souhrnné zkoušky. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost a cytotoxicita a přesně se určí rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování. V průběhu souhrnného testování se zkouší přesně určené rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek v biotestech ERα CALUX, po nichž následuje klasifikace zkoušených chemických látek na agonistickou nebo antagonistickou aktivitu.

8. Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 59. Stručně řečeno, zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na agonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu 17β-estradiolu (PC_{10}). Zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na antagonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je menší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu tamoxifenu (PC_{80}).

POSTUP

Buněčné linie

9. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie U2OS ERα CALUX. Buněčnou linii lze získat od společnosti BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemsko na základě technické licenční smlouvy.

10. Používat by se měly pouze buněčné kultury bez mykoplazmat. Použité šarže buněk by měly být certifikovány jako negativní na kontaminaci mykoplazmatem, nebo by měl být před použitím proveden test na mykoplazma. Pro citlivou detekci mykoplazmové infekce se používá RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (9).

Stabilita buněčné linie

11. Aby se udržela stabilita a integrita buněk CALUX, měly by být buňky uchovávány v tekutém dusíku (–80 °C). Po rozmrazení je třeba buňky pro přípravu nové kultury subkultivovat alespoň dvakrát, než se použijí pro hodnocení estrogenní agonistické a antagonistické aktivity chemických látek. Buňky by neměly být subkultivovány déle než 30 pasáží.

12. Pro monitorování stability buněčné linie v čase by měla být reaktivita zkušebního systému agonistické a antagonistické aktivity ověřena hodnocením EC_{50} nebo IC_{50} referenčního standardu. Dále by měla být monitorována relativní indukce pozitivního kontrolního vzorku (PC) a negativního kontrolního vzorku (NC). Výsledky by měly odpovídat kritériím přijatelnosti pro biotest ERα CALUX agonistické (tabulka 3C) nebo antagonistické (tabulka 4C) aktivity. Referenční standardy, pozitivní a negativní kontroly jsou uvedeny v tabulce 1 a v tabulce 2 pro agonistický, respektive antagonistický režim.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

13. Buňky U2OS se kultivují v růstovém médiu (médium DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení jako indikátorem pH, doplněném fetálním bovinním sérem (7,5 %), neesenciálními aminokyselinami (1 %), 10 jednotkami/ml penicilinu, streptomycinu a geneticinu (G-418) jako selekčním markerem). Buňky se umístí do inkubátoru CO_2 (5 % CO_2) při teplotě 37 °C a 100 % vlhkosti vzduchu. Když buňky dosáhnou konfluence 85–95 %, buď se subkultivují, nebo připraví pro nasazení do 96jamkových mikrotitračních destiček. Ve druhém případě je třeba buňky resuspendovat ve zkušebním médiu 1 x 10^5 buněk/ml (DMEM/F12 (1:1) neobsahujícím estrogeny bez fenolové červeně, doplněném fetálním bovinním sérem ošetřeným aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (5 % obj.), neesenciálními aminokyselinami (1 % obj.), 10 jednotkami/ml penicilinu a streptomycinu) a umístit do jamek 96jamkových mikrotitračních destiček (100 µl homogenizované buněčné suspenze). 24 hodin před expozicí by buňky měly být předběžně inkubovány v inkubátoru (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu). Plastové pomůcky by neměly obsahovat estrogen.

Kritéria přijatelnosti

14. Agonistická a antagonistická aktivita zkoušených chemických látek se testuje ve zkušební sérii. Zkušební série sestává maximálně z 6 mikrotitračních destiček. Každá zkušební série obsahuje alespoň 1 celou sérii ředění referenčního standardu, pozitivní kontrolní vzorek, negativní kontrolní vzorek a kontroly s rozpouštědlem. Na obrázku 1 a 2 je znázorněno uspořádání destiček pro agonistickou a antagonistickou zkušební sérii.

15. Každé ředění referenčních standardů, zkoušených chemických látek, všechny kontroly s rozpouštědlem a pozitivní a negativní kontroly by měly být analyzovány třikrát. Každá ze tří analýz by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3A v tabulce 4A.

16. Na první destičce v každé zkušební sérii se měří celá série ředění referenčního standardu (17β-estradiol na agonistickou aktivitu; tamoxifen na antagonistickou aktivitu). Aby bylo možné porovnat výsledky analýzy zbývajících 5 mikrotitračních destiček s první mikrotitrační destičkou obsahující celou křivku závislosti odpovědi referenčního standardu na koncentraci, měly by všechny destičky obsahovat 3 kontrolní vzorky: kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci zkoušeného referenčního standardu a přibližnou koncentraci referenčního standardu EC_{50} (agonistická aktivita) nebo IC_{50} (antagonistická aktivita). Poměr průměrných kontrolních vzorků na první destičce a na zbývajících 5 destičkách by měl splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

17. Pro každou mikrotitrační destičku ve zkušební sérii se vypočítá faktor z (10). Faktor z se počítá s použitím odpovědí při nejvyšší a nejnižší koncentraci referenčního standardu. Mikrotitrační destička se považuje za platnou v případě, že splňuje požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

18. Referenční standard by měl vykazovat sigmoidní křivku závislosti odpovědi na dávce. Hodnoty EC_{50} nebo IC_{50} odvozené od odpovědi při sérii ředění referenčního standardu by měly splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

19. Každá zkušební série by měla obsahovat pozitivní kontrolní a negativní kontrolní vzorek. Vypočtená relativní indukce pozitivního i negativního kontrolního vzorku by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

20. V průběhu všech měření se indukční faktor nejvyšší koncentrace referenčního standardu měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) 17β-estradiolu průměrnou odpovědí RLU referenční kontroly s rozpouštědlem. Tento indukční faktor by měl splňovat formální požadavky na násobnou indukci uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

21. Za platné se považují pouze mikrotitrační destičky, které splňují všechna výše uvedená kritéria přijatelnosti, a tyto mikrotitrační destičky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek.

22. Kritéria přijatelnosti jsou použitelná pro předběžné screeningové zkoušky i pro souhrnné zkoušky.

Tabulka 1

Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest agonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	17β-estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$–$1*10^{-10}$
Pozitivní kontrola (PC)	17α-methyltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negativní kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabulka 2

Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest antagonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$–$1*10^{-5}$
Pozitivní kontrola (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negativní kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabulka 3

Kritéria přijatelnosti pro biotest agonistické aktivity ERα CALUX

	A - individuální vzorky na destičce	**Kritérium**
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu s výjimkou C0)	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro referenční standard a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (C0, SC))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytoxicity.	< 120 %
	B - v rámci jedné mikrotitrační destičky	
4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,5 až 2,0
5	Poměr přibl. hodnoty EC_{50} a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty EC_{50} a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4, C8)	0,70 až 1,30
6	Faktor Z pro každou destičku	> 0,6
	C - v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)	
7	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (17ß-estradiol)
8	Rozsah EC50 referenčního standardu 17ß-estradiol	$4*10^{-12}$–$4*10^{-11}$ M
9	Minimální násobná indukce nejvyšší koncentrace 17ß-estradiolu vzhledem ke kontrole referenčního standardu s rozpouštědlem.	5
10	Relativní indukce (%) PC.	> 30 %
11	Relativní indukce (%) NC	< 10 %

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Tabulka 4

Kritéria přijatelnosti pro biotest antagonistické aktivity ERα CALUX

	A – individuální vzorky na destičce	**Kritérium**
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu, kontrola s rozpouštědlem (C0))	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro kontrolu s vehikulem (VC) a nejvyšší koncentrace referenčního standardu (C8))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytoxicity.	≥ 120%
	B – v rámci jedné mikrotitrační destičky	
4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,70 až 1,30
5	Poměr přibl. hodnoty IC_{50} koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty IC_{50} koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4)	0,70 až 1,30
6	Poměr nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C8)	0,50 až 2,0
7	Faktor z pro každou destičku	> 0,6
	C – v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)	
8	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (tamoxifen)
9	Rozsah IC50 referenčního standardu (tamoxifen)	$1*10^{-8}$–$1*10^{-7}$ M
10	Minimální násobná indukce kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem vzhledem k nejvyšší koncentraci tamoxifenu.	2,5
11	Relativní indukce (%) PC.	< 70 %
12	Relativní indukce (%) NC	> 85 %

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; VC: kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu); SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly

23. Při předběžných screeningových zkouškách i souhrnných zkouškách by se měla používat stejná kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly a negativní kontroly. Dále by měla být stejná koncentrace referenčních standardů, pozitivních kontrol a negativních kontrol.

Kontrola s rozpouštědlem

24. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s rozpouštědlem. Při validaci biotestu ERα CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu. Nezapomeňte, že kontrola s rozpouštědlem u antagonistických studií obsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiol (přibližně koncentrace EC_{50}). Pro testování rozpouštědla použitého pro antagonistické studie je třeba připravit a otestovat kontrolu s vehikulem.

Kontrola s vehikulem (antagonistická aktivita)

25. Při testování antagonistické aktivity se zkušební médium doplňuje pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol (přibližně koncentrace EC_{50}). Pro testování rozpouštědla použitého k rozpuštění zkoušených chemických látek při zkoušce na antagonistickou aktivitu je třeba připravit zkušební médium bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17β-estradiol. Tento kontrolní vzorek se označuje jako kontrola s vehikulem. Při validaci biotestu ERα CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu.

Referenční standardy

26. Agonistickým referenčním standardem je 17β-estradiol (tabulka 1). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací 17β-estradiolu ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistickým referenčním standardem je tamoxifen (tabulka 2). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací tamoxifenu ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Každá koncentrace antagonistického referenčního standardu se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Pozitivní kontrola

28. Pozitivní kontrolou pro agonistické studie je 17α-methyltestosteron (tabulka 1).

29. Pozitivní kontrolou pro antagonistické studie je 4-hydroxytamoxifen (tabulka 2). Antagonistická pozitivní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Negativní kontrola

30. Negativní kontrolou pro agonistické studie je kortikosteron (tabulka 1).

31. Negativní kontrolou pro antagonistické studie je resveratrol (tabulka 2). Antagonistická negativní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3{,}0*10^{-12}$ M).

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

32. Rozpouštědlo použité na rozpuštění zkoušených chemických látek by mělo zkoušenou chemickou látku zcela rozpustit a mělo by být mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými rozpouštědly jsou DMSO, voda a etanol (čistota 95 % až 100 %). Jestliže se jako rozpouštědlo používá DMSO, neměla by maximální koncentrace DMSO při inkubaci překročit 1 % (obj.). Před použitím by rozpouštědlo mělo být otestováno, zda není cytotoxické a zda neinterferuje s provedením analýz.

Příprava referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek

33. Referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly a zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100 % DMSO (nebo ve vhodném rozpouštědle). Poté se ve stejném rozpouštědle připraví příslušná (postupná) ředění. Před rozpuštěním by se měly všechny látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. V čerstvě připravené zásobě roztoků referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek by neměla být znatelná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně. Před každým experimentem by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. Konečná ředění referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek by se měla připravit čerstvá pro každý experiment a použít do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost, cytotoxicita a zjištění rozsahu

34. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost zkoušených chemických látek ve zvoleném rozpouštědle. Připraví se zásoba v maximální koncentraci 0,1 M. Pokud tato koncentrace vykazuje problémy s rozpustností, je třeba připravit zásobní roztoky s nižší koncentrací, dokud nebudou zkoušené chemické látky zcela rozpustné. Při předběžné screeningové zkoušce se testují postupná ředění zkoušené chemické látky 1:10. Maximální koncentrace pro testování agonistů nebo antagonistů je 1 mM. Po předběžné screeningové zkoušce se odvodí vhodný upřesněný rozsah koncentrací pro zkoušené chemické látky, jež mají být testovány v souhrnných zkouškách. Ředění použitá pro souhrnné testování by měla být 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x a 3000x.

35. V protokolu analýzy agonistů a antagonistů je zařazeno testování cytotoxicity (11). Testování cytotoxicity je začleněno do předběžné screeningové zkoušky i do souhrnných zkoušek. Při validaci biotestu ERα CALUX se pro posouzení cytotoxicity použila zkouška na průnik laktát dehydrogenázy v kombinaci s kvalitativní vizuální kontrolou buněk (viz dodatek 4.1) po expozici zkoušeným chemickým látkám. Mohou však být použity i jiné kvantitativní metody pro stanovení cytotoxicity (např. kolorimetrická analýza na bázi tetrazolia (MTT) nebo biotest cytotoxicity CALUX). Obecně, koncentrace zkoušených chemických látek, které vykazují více než 20 % redukci životaschopnosti, se považují za cytotoxické, a proto nemohou být použity pro hodnocení dat. Pokud jde o analýzu průniků LDH, považuje se koncentrace zkoušené chemické látky za cytotoxickou, když je procento průniku LDH větší než 120 %.

Expozice zkoušené chemické látce a organizace testovacích destiček

36. Po přidání trypsinu do konfluentní lahve s kultivovanými buňkami se buňky resuspendují na 1 x 10^5 buněk/ml ve zkušebním médiu bez estrogenů. 100 µl resuspendovaných buněk se umístí do vnitřních jamek 96jamkové mikrotitrační destičky. Vnější jamky se naplní 200 µl fosfátového pufru (PBS) (viz obrázky 1 a 2). Buňky na destičkách se předběžně inkubují po dobu 24 hodin dne v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu).

37. Po předběžné inkubaci se destičky prohlédnou, zda nejeví vizuální známky cytotoxicity (viz dodatek 4.1), kontaminace a konfluence. Pro testování se použijí pouze destičky, které nejeví žádné vizuální známky cytotoxicity a kontaminace a které mají minimálně 85 % konfluenci. Médium z vnitřních jamek se opatrně odstraní a nahradí 200 µl zkušebního média bez estrogenu obsahujícího příslušnou sérii ředění referenčních standardů, zkoušených chemických látek, pozitivních kontrol, negativních kontrol a kontrol s rozpouštědlem (tabulka 5: studie agonistů; tabulka 6: studie

antagonistů). Všechny referenční standardy, zkoušené chemické látky, pozitivní kontroly, negativní kontroly a kontroly s rozpouštědlem se testují třikrát. Na obrázku 1 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení agonistů. Na obrázku 2 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení antagonistů. Uspořádání destičky pro předběžné screeningové testování a souhrnné testování je stejné. Při testování antagonistů obsahují všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M). Nezapomeňte, že na každou destičku TC je třeba přidat referenční standardy C8 a C4.

38. Po expozici buněk všem chemickým látkám se 96jamkové mikrotitrační destičky inkubují po dobu dalších 24 hodin v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu).

Obrázek 1

Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení agonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

PC = pozitivní kontrola

NC = negativní kontrola

TCx-(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Obrázek 2

Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení antagonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

NC = negativní kontrola

PC = pozitivní kontrola

TCx–(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

VC = kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Poznámka: Všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), obsahují také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu ($3{,}0*10^{-12}$ M).

Měření luminiscence

39. Měření luminiscence je podrobně popsáno v protokolu analýzy agonistů a antagonistů (10). Médium by se mělo z jamek odstranit a buňky by se po 24 hodinách inkubace měly štěpit, aby se otevřela buněčná membrána a umožnilo měření luciferázové aktivity.

40. Pro měření luminiscence vyžaduje tento postup luminometr vybavený dvěma injektory. Reakce luciferázy začíná vstříknutím substrátu luciferin. Reakce se zastaví přidáním 0,2 M NaOH. Reakce je zastavena, aby nedocházelo k přenosu luminiscence z jedné jamky do druhé.

41. Světlo emitované z každé jamky se vyjadřuje v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) na jamku.

Předběžná screeningová zkouška

42. Výsledky předběžné screeningové analýzy se použijí k určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování. Hodnocení výsledků předběžné screeningové analýzy a určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování je podrobně popsáno v protokolech pro analýzu agonistů a antagonistů (10). Zde je uveden stručný souhrn postupů pro určení rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro analýzu agonistů a antagonistů. Viz tabulky 5 a 6, kde je uveden návod na způsob postupného ředění.

Volba koncentrací pro posouzení agonistických účinků

43. Při předběžné screeningové zkoušce se zkoušené chemické látky testují pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).

44. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

45. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:

— je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,

— předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální indukci. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.

46. Když je pozorována platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální indukce a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.

47. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 5, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.

48. Zkoušená chemická látka, která nevyvolává žádný agonistický účinek, se testuje v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací určenou v průběhu předběžného screeningu.

Volba koncentrací pro posouzení antagonistických účinků

49. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

50. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:

— je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,

— předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální inhibici. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.

51. Když je zjištěna platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální inhibice a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.

52. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 6, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.

53. Zkoušené chemické látky, které nevyvolávají žádný antagonistický účinek, se testují v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací otestovanou v průběhu předběžného screeningu.

Souhrnné zkoušky

54. Po výběru zpřesněných rozmezí koncentrací se zkoušené chemické látky testují souhrnně pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).

55. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3 a 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

Tabulka 5

Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování agonistů

Referenční 17β-estradiol		TCx – předběžná screeningová zkouška		TCx – souhrnná zkouška		Kontroly	
konc. (M)		ředění		ředění		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx – zkoušená chemická látka x
PC – pozitivní kontrola (17α-methyltestosteron)
NC – negativní kontrola (kortikosteron)
C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem
SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem

Tabulka 6

Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování antagonistů

Referenční tamoxifen		TCx – předběžná screeningová zkouška		TCx – souhrnná zkouška		Kontroly	
konc. (M)		ředění		ředění		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Doplněný agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx – zkoušená chemická látka x
PC – pozitivní kontrola (4-hydroxytamoxifen)
NC – negativní kontrola (resveratrol)
C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem
SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem
VC – kontrola s vehikulem (neobsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M)

Sběr a analýza dat

56. Po předběžné screeningové zkoušce a souhrnných zkouškách se stanoví EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} a maximální indukce (TCx_{max}) zkoušené chemické látky pro testování agonistických účinků. Pro testování antagonistických účinků se stanoví IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} a minimální indukce (TCx_{min}). Na obrázku 3 (agonistická aktivita) a 4 (antagonistická aktivita) jsou tyto parametry znázorněny graficky. Potřebné parametry se vypočítají podle relativní indukce každé zkoušené chemické látky (ve vztahu k maximální indukci referenčního standardu (= 100 %)). Pro hodnocení dat se použije nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry), a to podle následující rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

kde:

X = logaritmus dávky nebo koncentrace

Y = odpověď (relativní indukce (%))

Top = maximální indukce (%)

Bottom = minimální indukce (%)

$logEC_{50}$ = logaritmus koncentrace, při níž je pozorováno 50 % maximální odpovědi

Hillův koeficient = míra sklonu nebo Hillova křivka

57. Nezpracovaná data z luminometru, vyjádřená jako relativní luminiscenční jednotky (RLU), je třeba převést do tabulkového editoru pro analýzu dat určeného pro předběžné screeningové a souhrnné zkoušky. Nezpracovaná data by měla splňovat kritéria přijatelnosti uvedená v tabulce 3A a 3B (agonistická aktivita) nebo 4A a 4B (antagonistická aktivita). V případě, že nezpracovaná data splňují kritéria přijatelnosti, provede se výpočet v následujících krocích pro stanovení potřebných parametrů:

Agonistická aktivita

— Odečtěte průměrné jednotky RLU kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.

— Odečtěte průměrné jednotky RLU kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejvyšší koncentrace referenčního standardu na 100 %.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejvyšší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).

— Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} referenčního standardu.

— Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} zkoušených chemických látek.

— Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{max}).

— Určete hodnoty PC_{10} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty EC_{50}, EC_{10} a PC_{50}. V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC_{10} and TC_{max}.

Antagonistická aktivita

— Odečtěte průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.

— Odečtěte průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejnižší koncentrace referenčního standardu na 100 %.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejnižší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).

— Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} referenčního standardu.

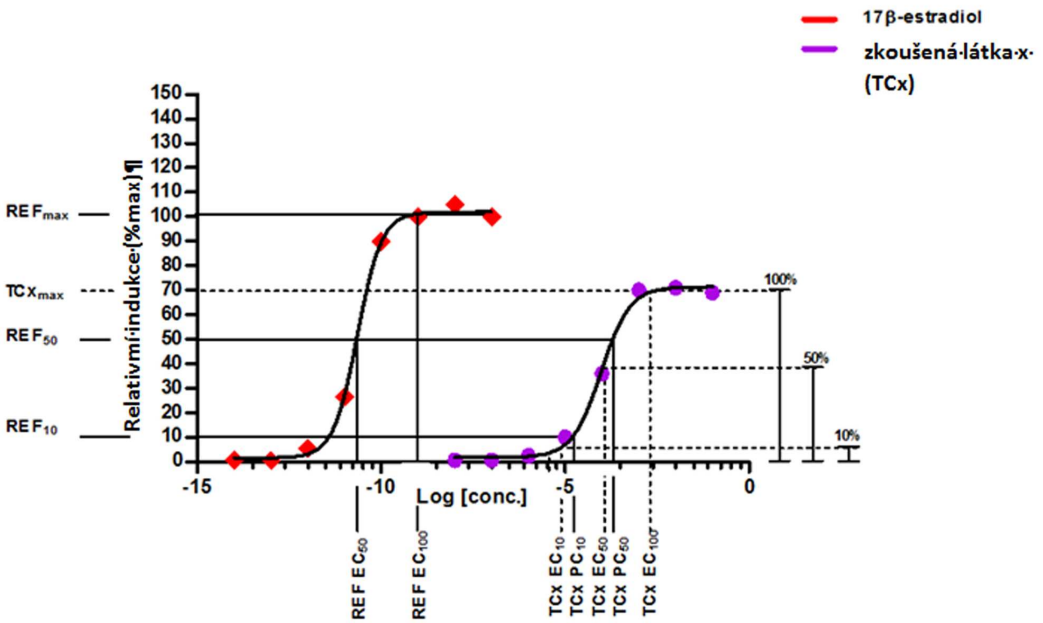
— Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} zkoušených chemických látek.

— Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{min}).

— Určete hodnoty PC_{80} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

Obrázek 3

Přehled parametrů stanovených v analýze agonistů



EC_{10} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 10 % její maximální odpovědi

EC_{50} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi

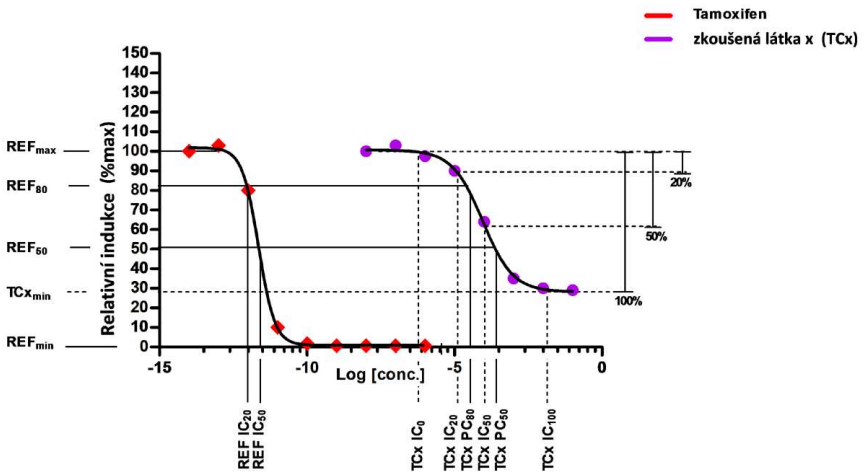
PC_{10} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{10} referenčního standardu

PC_{50} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{50} referenčního standardu

TCx_{max} = maximální relativní indukce zkoušené chemické látky.

Obrázek 4

Přehled parametrů stanovených v analýze antagonistů



IC20 = koncentrace látky, při níž je pozorováno 80 % její maximální odpovědi (20 % inhibice)

IC50 = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi (50 % inhibice)

PC80 = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC_{20} referenčního standardu

PC50 = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC_{50} referenčního standardu

TCxmin = minimální relativní indukce zkoušené chemické látky.

U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty IC_{50}, IC_{20} a PC_{50}. V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC_{20} a TC_{min}.

58. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

— splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti, odstavce 14–22),

— být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

59. Pro interpretaci údajů a rozhodnutí, zda je zkoušená chemická látka považována za pozitivní, nebo negativní, se používají tato kritéria:

Agonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

1 TC_{max} se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).

2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10}.

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

1 TC_{max} není vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).

2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10}.

Antagonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

1 TC_{min} se rovná nebo je nižší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{80} = 20 % inhibice).

2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80}.

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

1 TC_{min} je vyšší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{80} = 20 % inhibice).

2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80}.

60. Aby bylo možné charakterizovat sílu pozitivní odpovědi zkoušené chemické látky, uvedou se velikost účinku (agonistická aktivita: TC_{max}; antagonistická aktivita: TC_{min}) a koncentrace, při níž k účinku dochází (agonistická aktivita: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistická aktivita: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

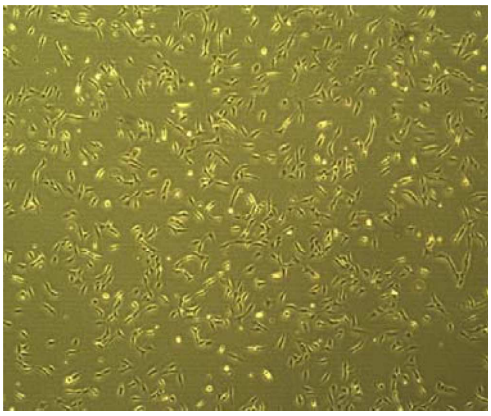
(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

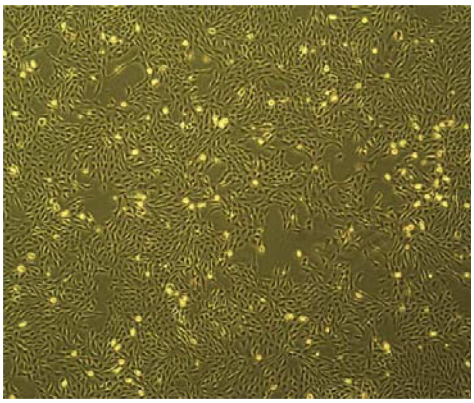
(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Dodatek 4.1:

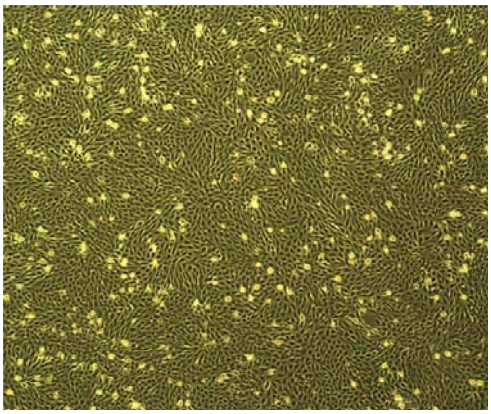
VIZUÁLNÍ KONTROLA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK



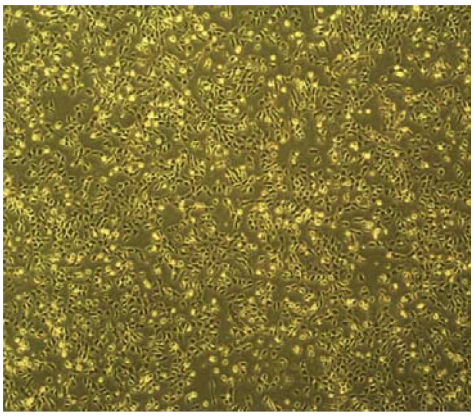
< 5 % konfluence. Buňky byly právě nasazeny. 100 % životaschopnost buněk. Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



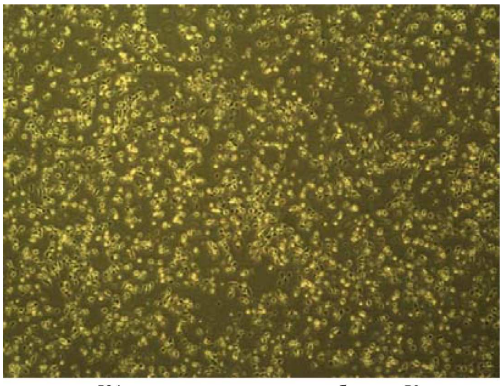
> 85 % konfluence. V tomto stádiu jsou buňky exponovány zkoušeným chemickým látkám. > 95 % životaschopnost buněk.
Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



> 95 % konfluence. Buňky jsou hustě směstnány a začínají přerůstat. > 95 % životaschopnost buněk.
Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



< 25 % životaschopnost buněk. Buňky se od sebe oddělují a kontakt mezi nimi se snižuje. Buňky jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“



< 5 % životaschopnost buněk. Buňky jsou od sebe zcela odděleny a kontakt mezi nimi je porušen. Buňky jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“

B.67 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENU THYMIDINKINÁZY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 490 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají a revidují s ohledem na vědecký pokrok, potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Test myšího lymfomu (MLA) a test TK6 využívající lokus thymidinkinázy (TK) byly původně obsaženy ve zkušební metodě B.17. Následně expertní pracovní skupina pro MLA Mezinárodního semináře o zkoušení genotoxicity (IWGT) vyvinula mezinárodní harmonizovaná doporučení pro kritéria přijatelnosti tohoto testu a interpretaci dat MLA (1)(2)(3)(4)(5) a uvedená doporučení jsou začleněna do této nové zkušební metody B.67. Tato zkušební metoda je napsána pro test MLA, a protože využívá také lokus TK, pro test TK6. Zatímco test MLA se používá běžně pro regulační účely, test TK6 se používá mnohem méně často. Je třeba uvést, že i přes podobnost mezi cílovými parametry nejsou tyto dvě buněčné linie vzájemně zaměnitelné a regulační programy mohou platně vyjádřit preferenci jedné nebo druhé pro konkrétní regulační použití. Například validace testu MLA prokázala jeho vhodnost pro detekci nejen genových mutací, ale také schopnosti zkoušené chemické látky indukovat strukturální chromozomální poškození. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (6).

2. Účelem zkoušek na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací indukovaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního genu thymidinkinázy (*TK* pro lidské buňky a *Tk* pro buňky hlodavců, společně v této zkušební metodě nazývané jen *TK*). Tato zkušební metoda je určena k použití se dvěma buněčnými liniemi: buněčnou linií myšího lymfomu L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (obecně nazývanou L5178Y) a buněčnou linií lidského lymfoblastoidu TK6 (obecně nazývanou TK6). I když se tyto dvě buněčné linie liší vzhledem ke svému původu, růstu buněk, stavu p53 atd., mohou být testy genových mutací *TK* prováděny podobným způsobem u obou typů buněk, jak je popsáno v této zkušební metodě.

3. Autozomální a heterozygotní povaha genu thymidinkinázy umožňuje detekci životaschopných kolonií, jejichž buňky jsou deficitní na enzym thymidinkinázu po mutaci z $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$. Tento deficit může vyplývat z genetických jevů ovlivňujících gen *TK* včetně genových mutací (bodové mutace, posunové mutace, malé delece atd.) i chromozomálních změn (velké delece, přestavby chromozomu a mitotické rekombinace). Posledně jmenované změny se projevují jako ztráta heterozygotnosti, což je běžná genetická změna genů tlumících nádory v lidské tumorigenezi. Teoreticky může být testem MLA detekována ztráta celého chromozomu nesoucího gen *TK* v důsledku poškození vřetene a/nebo mitotické nondisjunkce. Kombinace cytogenetické a molekulární analýzy jasně ukazuje, že některé mutace MLA TK jsou výsledkem nondisjunkce. Průkazné důkazy však ukazují, že testy genové mutace *TK* nemohou spolehlivě detekovat aneugeny při aplikaci standardních kritérií cytotoxicity (jak je popsáno v této zkušební metodě), a proto není vhodné používat tyto testy na detekci aneugenů (7)(8)(9).

4. Při testech genových mutací *TK* se generují dvě odlišné fenotypové třídy mutantů *TK*; normálně rostoucí mutanti rostoucí stejnou rychlostí jako heterozygotní buňky TK a pomalu rostoucí mutanti rostoucí s prodlouženou dobou zdvojení. Normálně rostoucí i pomalu rostoucí mutanti se v testu MLA rozpoznávají jako mutanti tvořící velké kolonie a mutanti tvořící malé kolonie a v testu TK6 jako mutanti tvořící časné kolonie a mutanti tvořící pozdní kolonie. Podrobně byla zkoumána molekulární a cytogenetická povaha mutantů MLA tvořících jak velké kolonie, tak malé kolonie (8)(10)(11)(12)(13). Rovněž byla rozsáhle studována molekulární a cytogenetická povaha mutantů TK6 tvořících časné kolonie i pozdní kolonie (14)(15)(16)(17). Pomalu rostoucí mutanti u obou buněčných druhů vykazovali genetické poškození, které zahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu *TK*, což má za následek prodlouženou dobu zdvojení a vznik pozdních nebo malých kolonií (18). Indukce pomalu rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které indukují silné strukturální změny na úrovni chromozomů (26). Buňky, jejichž poškození nezahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu TK, rostou podobnou rychlostí jako mateřské buňky a vzniknou z nich normálně rostoucí mutanti. Indukce primárně normálně rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které primárně působí jako bodové mutageny. Proto je velmi důležité spočítat jak pomalu rostoucí, tak i normálně rostoucímu mutanty, aby se zjistily všechny mutace a získaly informace o druhu (druzích) poškození (mutageny oproti klastogenům) indukovaného zkoušenou chemickou látkou (10)(12)(18)(19).

5. Zkušební metoda je uspořádána tak, aby poskytla obecné informace, které platí pro test MLA i TK6, a specializovaný návod pro individuální testy.

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.

8. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny interakcí mezi zkoušenou chemickou látkou a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality, interakce se složkami média (20) (21) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (22)(23)(24). Pro testy MLA a TK6 se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 28 považuje za nadměrnou. Dále je třeba poznamenat, že zkoušené chemické látky, které jsou analogy thymidinu nebo které se chovají jako analogy thymidinu, mohou zvyšovat frekvenci mutací selektivním růstem spontánních mutantů na pozadí při ošetření buněk a vyžadovat tak další zkušební metody pro adekvátní hodnocení (25).

9. Při zkoušení vyráběných nanomateriálů mohou být potřebné určité úpravy metody, které však v této zkušební metodě nejsou popsány.

10. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

11. Mutantní buňky, které v důsledku mutace $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$ vykazují deficit aktivity enzymu thymidinkináza, jsou rezistentní k cytostatickým účinkům analogu pyrimidinu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující *TK* jsou citlivé na TFT, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TFT a tvoří viditelné kolonie, zatímco buňky, které obsahují TK, tuto schopnost nemají.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Buňky v suspenzi jsou vhodnou dobu (viz odstavec 33) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivace (viz odstavec 19), tak bez něj a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů. Cytotoxicita se stanoví podle relativního celkového růstu (RTG – viz odstavec 25) v testu MLA a podle relativního přežití (RS – viz odstavec 26) v testu TK6. Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý zvolený typ buněk (viz odstavec 37), aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací. Po fenotypové expresi se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

13. Pro test MLA: Protože test MLA byl vyvinut a charakterizován pomocí sublinie $TK^{+/-}$ −3.7.2C buněk L5178Y, musí být pro test MLA použita tato specifická sublinie. Buněčná linie L5178Y byla odvozena od lymfomu brzlíku indukovaného methylcholanthrenem z DBA-2 myši (26). Clive a spolupracovníci ošetřili buňky L5178Y (které Clive označil jako $TK^{+/+}$ −3) ethyl-metansulfonátem a izolovali klon $TK^{-/-}$ (označený jako $TK^{-/-}$ −3.7) pomocí

bromodeoxyuridinu jako selekčního činidla. Z klonu $TK^{-/-}$ byly izolovány spontánní klon $TK^{+/-}$ (označený jako $TK^{+/-}$ −3.7.2.) a subklon (označený jako $TK^{+/-}$−3.7.2C) a charakterizovány pro použití v testu MLA (27). Karyotyp pro buněčnou linii byl zveřejněn (28)(29)(30)(31). Modální hodnota počtu chromozomů je 40. Je zde jeden metacentrický chromozom (t12;13), který by se měl počítat jako jeden chromozom. Myší lokus *TK* je umístěn na distálním konci chromozomu 11. Buněčná linie L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C má mutace v obou alelách p53 a vytváří mutantní protein p53 (32)(33). Za schopnost testu detekovat rozsáhlé poškození je pravděpodobně odpovědný stav p53 buněčné linie $TK^{+/-}$−3.7.2C (17).

14. Pro TK6: TK6 je buněčná linie lidského lymfoblastoidu. Mateřskou buněčnou linií je transformovaná buněčná linie viru Epstein-Barrové, WI-L2, která byla původně získána od pětiletého chlapce s hereditární sférocytózou. První izolovaný klon, HH4, byl zmutován ICR191 a byla vytvořena heterozygotní *TK* buněčná linie, TK6 (34). Buňky TK6 jsou téměř diploidní a reprezentativní karyotyp je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21 (35). Na dlouhém rameni chromozomu 17 se nachází lidský lokus *TK*. TK6 je p53-kompetentní buněčná linie, protože má v obou alelách sekvenci p53 divokého typu a exprimuje pouze protein p53 divokého typu (36).

15. Pro MLA i TK6 se doporučuje, aby zkoušející laboratoř při prvním vytváření nebo doplňování základní zásoby zkontrolovala nepřítomnost mykoplazmové kontaminace, určila karyotyp buněk nebo obarvila chromozomy s lokusem *TK* a zkontrolovala dobu zdvojení populace. Pro buňky použité ve zkušební laboratoři by měla být stanovena normální délka buněčného cyklu, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře (16)(19)(37). Tuto základní zásobu je třeba skladovat při −150 °C nebo méně a používat na přípravu veškeré pracovní zásoby buněk.

16. Buď před vytvořením velkého množství zmrazené pracovní zásoby, nebo bezprostředně před použitím v experimentu může být nutné očistit kulturu od již existujících mutantních buněk [pokud již není frekvence mutací (MF) v kontrole s rozpouštědlem v přijatelném rozsahu – viz tabulka 2 pro MLA)]. Provádí se to pomocí methotrexátu (aminopterin), kterým se vyselektují TK-deficitní buňky, a přidáním thymidinu, hypoxanthinu a glycinu (L5178Y) nebo 2'-deoxycytidinu (TK6) do kultury pro zajištění optimálního růstu TK-kompetentních buněk (19)(38)(39) a (40) pro TK6). Obecné rady týkající se správného postupu udržování buněčných kultur i konkrétní rady pro buňky L5178Y a TK6 lze nalézt v (19)(31)(37)(39)(41). Laboratoře, které potřebují základní zásobu buněk, aby mohly iniciovat MLA nebo TK6, nebo si chtějí pořídit novou základní zásobu buněk, mají k dispozici buněčný archív s dobře charakterizovanými buňkami (37).

Média a podmínky kultivace

17. U obou zkoušek by pro udržování kultur mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (např. kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, inkubační teplota 37 °C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité zvolit média a podmínky kultivace tak, aby byly zajištěny optimální růst buněk během období exprese a klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk. Pro MLA i TK6 je také důležité, aby podmínky kultivace zajišťovaly optimální růst velkých kolonií/časných kolonií i malých kolonií/pozdních kolonií mutantů TK. Podrobnější informace o kultivaci, včetně nutnosti správně tepelně inaktivovat koňské sérum, jestliže se při selekci mutantů používá médium RPMI, lze nalézt v (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Příprava kultur

18. Buňky se pomnoží z kmenových kultur a nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby kultury v suspenzích pokračovaly v exponenciálním růstu po celou dobu expozice a exprese.

Metabolická aktivace

19. Při použití buněk L5178Y and TK6 by se měly použít exogenní metabolizující systémy, protože tyto buňky mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (43)(44)(45) nebo kombinace fenobarbitalu a β-naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Posledně jmenovaná

kombinace není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (52) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (45)(46)(47)(48)(49). Frakce S9 je obvykle používána v koncentracích od 1–2 % obj., avšak v konečném testovacím médiu je možné koncentraci zvýšit do 10 % obj. Volbu typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených chemických látek.

Příprava zkoušených chemických látek

20. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 21). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (53)(54)(55). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

21. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou voda nebo dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami, zkušebním systému a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxická. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1, Definice) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

MĚŘENÍ CYTOTOXICITY A VOLBA EXPOZIČNÍCH KONCENTRACÍ

22. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odpověď, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 28), srážení (viz odstavec 29) kultivačního média nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 8). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, bylo by možné pH upravit pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

23. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 27–30). Hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, avšak předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Jestliže se provádí experiment ke zjištění rozsahu, měl by zahrnovat široké rozmezí koncentrací, přičemž může být ukončen buď v den 1 po expozici, nebo pokračovat expresí v den 2 a k selekci mutantů (pokud se budou použité koncentrace jevit jako vhodné).

24. Cytotoxicita by měla být stanovena pro každou jednotlivou zkoušenou kulturu i kontrolní kulturu: metody pro MLA (2) a TK6 (15) jsou definovány podle mezinárodně dohodnuté praxe.

25. Pro obě verze testu MLA, s použitím agaru i mikrotitračních destiček: Cytotoxicita se hodnotí podle relativního celkového růstu (RTG), který původně definoval v roce 1975 Clive a Spector (2). Toto měření zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v průběhu expozice buněk, dobu exprese a relativní účinnost klonování (RCE: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v době, kdy jsou selektováni mutanti (2). Je třeba poznamenat, že RSG zahrnuje každou ztrátu buněk, k níž dojde ve zkoušené kultuře v průběhu expozice (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

26. Pro TK6: Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití (RS), tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s negativní kontrolou (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).

27. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (55). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu, jak je popsáno v odstavci 28, po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost odpovědi na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 70). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.

28. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 % RTG u MLA a mezi 20 a 10 % RS u TK6 (odstavec 67).

29. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Protože testy MLA i TK6 používají kultury v suspenzi, je třeba zvláště dbát na to, aby provádění zkoušky nemohla ovlivňovat sraženina. Užitečné může být také stanovení rozpustnosti v kultivačním médiu před pokusem.

30. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (57) (58). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu [tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)], přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59).

Kontroly

31. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 21) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.

32. K prokázání schopnosti laboratoře stanovit mutageny za podmínek použitého zkušebního protokolu, (případně) účinnosti exogenního systému metabolické aktivace a k prokázání adekvátní detekce malých/pozdních a velkých/časných *TK* mutantů jsou nutné souběžné pozitivní kontroly. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož zkoušky genetické toxicity savčích buněk *in vitro* při krátkodobé expozici (3–4 hodiny) prováděné souběžně s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace s použitím stejné doby trvání expozice jsou již dostatečně standardizovány, je možné použití pozitivních kontrol omezit na testování mutagenu vyžadujícího metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Pokud se však používá dlouhodobá expozice (tj. 24 hodin bez S9), měla by mít svou vlastní pozitivní kontrolu, protože doba trvání expozice bude odlišná než při zkoušce za použití metabolické aktivace. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 28).

Tabulka 1

Referenční látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol

Kategorie	Látka	CASRN
1. Mutageny působící bez metabolické aktivace		
methyl-methansulfonát		66-27-3
mitomycin C		50-07-7
4-nitrochinolin-1-oxid		56-57-5
2. Mutageny vyžadující metabolickou aktivaci		
benzo[a]pyren		50-32-8
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát)		50-18-0 R60/6055/-19-2
7,12-dimethylbenzoanthracen		57-97-6
3-methylcholanthren		56-49-5

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látce

33. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 4 hodin). Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59). Pro MLA, v případech, kdy krátkodobá expozice dává negativní výsledky a existují informace naznačující nutnost dlouhodobější expozice [např. analoga nukleosidů, špatně rozpustné chemické látky (5)(59)], je třeba zvážit provedení zkoušky s delší expozicí, tj. 24 hodin bez S9.

34. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat v každé experimentální kultuře dostatečný počet buněk, aby bylo uchováno v každé fázi zkoušky alespoň 10, ideálně však 100 spontánních mutantů (expozice, fenotypová exprese a selekce mutantů) (56).

35. Pro MLA je doporučená přijatelná frekvence spontánních mutací mezi $35–140 \times 10^{-6}$ (verze s agarem) a $50–170 \times 10^{-6}$ (verze s mikrotitračními destičkami) (viz tabulka 2). Pro získání alespoň 10 a ideálně 100 spontánních mutantů, kteří v každé zkoušené kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 6×10^6 buněk. Exponování takového počtu buněk a zachování dostatečného počtu buněk v průběhu exprese a klonování pro selekci mutantů poskytuje dostatečný počet spontánních mutací (10 nebo více) ve všech fázích experimentu, a to i u kultur exponovaných při koncentracích, jejichž výsledkem je 90 % cytotoxicita (měřeno podle 10 % RTG) (19)(38)(39).

36. U TK6 činí četnost spontánních mutací obvykle 2 až 10×10^{-6}. Pro získání alespoň 10 spontánních mutantů, kteří v každé kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 20×10^6 buněk. Expozice tohoto počtu buněk zajistí dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90 % cytotoxicitu (10 % relativní přežití). Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (60).

Doba exprese fenotypu a měření cytotoxicity a četnosti mutací

37. Na konci expoziční doby se buňky po stanovenou dobu kultivují, aby se umožnila téměř optimální fenotypová exprese nově indukovaných mutantů, specifická pro každou buněčnou linii. U testu MLA je doba fenotypové exprese 2 dny. U testu TK6 činí doba fenotypové exprese 3–4 dny. Jestliže se použije 24hodinová expozice, začíná doba exprese po ukončení expozice.

38. V průběhu doby fenotypové exprese se buňky počítají každý den. U testu MLA se denní počet buněk použije pro výpočet denního růstu v suspenzi (SG). Po dvoudenním období exprese se buňky suspendují v médiu se selekčním činidlem a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů (destičky pro selekci), respektive účinnosti klonování (destičky pro životaschopnost). Pro test MLA existují dvě stejně přijatelné metody pro selektivní klonování mutantů; jedna s použitím měkkého agaru a druhá s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (19)(38)(39). Klonování v testu TK6 se provádí s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (16).

39. Jediným doporučeným selekčním činidlem pro mutanty *TK* je triflurothymidin (TFT) (61).

40. U testu MLA se agarové destičky a mikrotitrační destičky počítají po 10–12 dnech inkubace. U testu TK6 se po 10–14 dnech stanoví skóre časných kolonií mutantů v mikrotitračních destičkách. Za účelem obnovení pomalu rostoucích (pozdních kolonií) mutantů TK6 je třeba po spočítání časných kolonií mutantů dodat buňkám růstové médium a TFT a poté destičky inkubovat dalších 7–10 dnů (62). Viz odstavce 42 a 44, kde je uvedena diskuze o vyčíslení mutantů *TK* s pomalým a normálním růstem.

41. Příslušné výpočty pro tyto dva testy včetně obou metod (agar a mikrodestičky) pro test MLA jsou uvedeny v dodatku 2. U testu MLA s použitím agarové metody se spočítají kolonie a počet mutantních kolonií se upraví podle účinnosti klonování, aby bylo možné vypočítat četnost mutací. U testu MLA ve verzi s mikrodestičkami a u testu TK6 se stanoví účinnost klonování u destiček pro selekci i destiček pro účinnost klonování podle Poissonova rozdělení (63). Z těchto dvou hodnot účinnosti klonování se vypočítá četnost mutací.

Charakterizace mutantních kolonií

42. Je-li u testu MLA zkoušená chemická látka pozitivní (viz odstavce 62–63), charakterizace podle velikosti nebo růstu kolonií by měla být provedena alespoň na jedné ze zkušebních kultur (obvykle na kultuře s nejvyšší pozitivní koncentrací) a na negativních a pozitivních kontrolách. Je-li zkoušená látka negativní (viz odstavec 64), měla být charakterizace mutantních kolonií provedena na negativních a pozitivních kontrolách. U metody testu MLA s využitím mikrodestiček se mutanti tvořící malé kolonie definují jako kolonie pokrývající méně než 25 % průměru jamky a mutanti tvořící velké kolonie jako kolonie pokrývající více než 25 % průměru jamky. U agarové metody se na vyčíslení kolonií mutantů a stanovení jejich velikosti používá automatické počítadlo kolonií. Způsoby stanovení velikosti kolonií jsou podrobně popsány v literatuře (19)(38)(40). Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie na negativní a pozitivní kontrole.

43. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni mutanti tvořící velké i malé kolonie. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).

44. TK6: Normálně rostoucí a pomalu rostoucí mutanti se diferencují podle rozdílu v době inkubace (viz odstavec 40). U testu TK6 se obvykle stanoví skóre časných i pozdních mutantů pro všechny kultury včetně negativních a pozitivních kontrol. Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie u negativní a pozitivní kontroly. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni časní i pozdní mutanti. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).

Způsobilost laboratoře

45. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení prokázat, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (včetně neexponovaných kultur a různých rozpouštědel/vehikul). Odpovědi těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek se nepoužije na laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 47–50. V testu MLA by hodnoty dosažené u pozitivní i negativní kontroly měly odpovídat doporučením IWGT (viz tabulka 2).

46. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1) by měl být zkoumán s krátkou i dlouhou expozicí (pokud se používají dlouhé expozice) bez metabolické aktivace a také s krátkou expozicí a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobilost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovena účinnost systému metabolické aktivace a prokázána vhodnost podmínek pro růst buněk v průběhu expozice, fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

47. Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

48. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými negativními kontrolními údaji. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by aktuální negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95 % rozmezí této distribuce (64)(65).

49. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly jakosti, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (65)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (66). Další podrobnosti a doporučení jak vytvářet a používat historická data lze najít v literatuře (64).

50. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 27. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly být uvnitř 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře. Pokud jsou údaje z negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé, je to důkaz, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 49), a důkaz, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

51. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávajícími historickými kontrolními databázemi laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

52. Prezentace údajů pro test MLA i TK6 by měla zahrnovat údaje za exponované i kontrolní kultury potřebné pro výpočet cytotoxicity (RTG, respektive RS) a četnosti mutací, jak je popsáno níže.

53. U testu MLA by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RSG, RTG, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet mutantních kolonií (u agarové verze) nebo počet prázdných jamek (u mikrodestičkové verze). Četnost mutantů by měla být vyjádřena jako počet mutantních buněk na milion přeživších buněk. Je-li odpověď pozitivní, měly by se uvést četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie (anebo procento z celkové četnosti mutací) u alespoň jedné koncentrace zkoušené chemické látky (obvykle látky s nejvyšší pozitivní koncentrací) a negativní a pozitivní kontroly. V případě negativní odpovědi by se měla uvést četnost mutací tvořících malé a velké kolonie pro negativní a pozitivní kontrolu.

54. U testu TK6 by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RS, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet prázdných jamek u časných a pozdních mutací. Četnost mutací (MF) se vyjadřuje jako počet mutantních buněk na počet přeživších buněk a měla by zahrnovat celkovou MF i MF (anebo procento z celkové MF) časných a pozdních mutantů.

Kritéria přijatelnosti

55. Pro test MLA i test TK6 by měla být splněna tato kritéria před stanovením celkových výsledků za konkrétní zkoušenou chemickou látku:

— Test se provedl za dvou experimentálních uspořádání (krátká expozice s metabolickou aktivací a bez ní – viz odstavec 33), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům.

— Měl by být analyzovatelný adekvátní počet buněk a koncentrací (viz odstavce 27, 34–36).

— Kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 28–30.

Kritéria přijatelnosti pro negativní a pozitivní kontroly

56. Na základě analýzy expertní pracovní skupiny IWGT pro MLA zahrnující velké množství údajů o MLA byl dosažen mezinárodní konsensus ohledně specifických kritérií přijatelnosti pro MLA (1)(2)(3)(4)(5). Proto tato zkušební metoda poskytuje konkrétní doporučení pro určení přijatelnosti negativních a pozitivních kontrol a pro hodnocení výsledků jednotlivých látek v testu MLA. Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou.

57. V testu MLA by se mělo u každého experimentu hodnotit, zda neexponovaná kontrola / kontrola s rozpouštědlem splňuje kritéria přijatelnosti pracovní skupiny IWGT pro MLA ((4) a níže uvedená tabulka) pro: 1) četnost mutací (nezapomeňte, že přijatelné MF podle IWGT jsou jiné pro verzi testu MLA s agarem a verzi s mikrodestičkami), 2) účinnost klonování (CE) v době selekce mutantů a 3) růst v suspenzi (SG) pro kontrolu s rozpouštědlem (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

Tabulka 2

Kritéria přijatelnosti pro MLA

Parametr	Metoda s použitím měkkého agaru	Metoda s použitím mikrodestiček
Četnost mutantů	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Účinnost klonování	65–120 %	65–120 %
Růst v suspenzi	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)

58. V testu MLA by se u každé zkoušky mělo hodnotit také, zda pozitivní kontrola/y splňuje/í alespoň jedno z těchto dvou kritérií přijatelnosti stanovených pracovní skupinou IWGT:

— Pozitivní kontrola by měla prokázat absolutní nárůst celkové četnosti mutací, to znamená zvýšení nad spontánní četnost mutací na pozadí [indukovaná četnost mutací (IMF)] alespoň 300×10^{-6}. Alespoň 40 % IMF by se mělo projevit v četnosti mutací tvořících malé kolonie.

— Pozitivní kontrola má zvýšenou četnost mutací tvořících malé kolonie alespoň 150×10^{-6} nad MF pozorovanou u souběžné neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem (IMF tvořících malé kolonie 150×10^{-6}).

59. U testu TK6 bude zkouška přijatelná, jestliže se souběžná negativní kontrola považuje za přijatelnou pro přidání do databáze historických negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavcích 48–49. Kromě toho by souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 32) měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou.

60. U obou testů by horní mez cytotoxicity pozorovaná v kultuře pozitivní kontroly měla být stejná jako v experimentálních kulturách. To znamená, že poměr RTG/RS by neměl být menší než 10 %. K prokázání, že kritéria přijatelnosti byla u pozitivní kontroly splněna, postačí použít jednu koncentraci (nebo jednu z koncentrací kultur pozitivní kontroly, jestliže je použita více než jedna koncentrace). Dále musí být četnost mutací pozitivní kontroly v rámci přijatelného rozmezí stanoveného pro laboratoř.

Hodnocení a interpretace výsledků

61. Pro test MLA vykonala významnou práci v oblasti biologické relevance a kritérií pro pozitivní odpověď expertní pracovní skupina IWGT pro myší lymfom (4). Proto tato zkušební metoda poskytuje konkrétní doporučení pro interpretaci výsledků zkoušené chemické látky v testu MLA (viz odstavce 62–64). Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou. Proto jsou doporučení pro interpretaci dat v testu TK6 uvedena obecněji (viz odstavce 65–66). Další doporučení se vztahují na oba testy (viz odstavce 67–71).

MLA

62. Doporučuje se, aby způsob definování pozitivní a negativní odpovědi zajišťoval, že zvýšená četnost mutací bude biologicky relevantní. Místo statistické analýzy, která se obvykle používá u jiných testů, vychází z použití předem definované indukované frekvence mutací (tj. zvýšení frekvence mutací nad souběžnou kontrolu), určeného globálního hodnotícího faktoru (GEF), který vychází z analýzy distribuce dat o četnosti mutací u negativních kontrol od zúčastněných laboratoří (4). Pro agarovou verzi testu MLA je faktor GEF 90×10^{-6} a pro mikrodestičkovou verzi testu MLA je faktor GEF 126×10^{-6}.

63. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), přesahuje zvýšení četnosti mutací nad souběžné pozadí faktor GEF a toto zvýšení souvisí s koncentrací (např. s použitím trend testu). Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutaci v tomto testovacím systému.

64. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), nedochází k žádné odpovědi v závislosti na koncentraci nebo četnost mutací, jestliže se zvýšila, nepřevyšuje faktor GEF. Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

TK6

65. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

— alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci (viz odstavec 33),

— všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 48).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (66)(67).

66. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

— žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodné zkoušky trendu ukáže, že nedochází k nárůstu v závislosti na koncentraci,

— všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 48).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

Pro MLA i TK6:

67. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo mezi 20 a 10 % RTG/RS. Podle konsensu je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány mezi 20 a 10 % RTG/RS, přičemž výsledek se nepovažuje za pozitivní, jestliže ke zvýšení četnosti dotací došlo pouze při 10 % RTG/RS nebo nižším poměru (pokud byl hodnocen) (2)(59).

68. Existují některé okolnosti, za nichž mohou pomoci další informace určit, že zkoušená chemická látka není mutagenní, když žádná kultura nevykazuje hodnotu RTG mezi 10–20 % RTG/RS. Jde o tyto situace: 1) V sérii datových bodů v rozmezí od 100 % do 20 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a alespoň jeden datový bod je mezi 20 % a 25 % RTG/RS. 2) V sérii datových bodů od 100 % do 25 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a také jeden datový bod je mírně pod 10 % RTG/RS. V obou těchto situacích lze zkoušenou chemickou látku posoudit jako negativní.

69. Ověření jasně pozitivního či jasně negativního účinku není nutné.

70. V případech, kdy odpověď není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek [např. rozsahu koncentrací, aby se zvýšila pravděpodobnost dosažení datových bodů v rozmezí 10–20 % RTG/RS, použití jiných podmínek metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9) a délky expozice].

71. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odpověď na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odpovědi).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

72. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— percentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

— druh a zdroj buněk a historie ve zkušební laboratoři,

— vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,

— metody udržování buněčných kultur,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění volby koncentrací a počtu buněčných kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,

— složení média, koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v µg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoumané chemické látky přidaných do kultivačního média,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— trvání expozice,

— hustota buněk během expozice;

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),

— látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,

— délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),

— identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,

— u testu MLA by měla být uvedena použitá verze (agar nebo mikrodestička),

— kritéria přijatelnosti zkoušek,

— metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk,

— metody použité pro měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— délka inkubace po umístění na destičky,

— definice kolonií podle velikosti a typu (případně včetně kritérií pro „malé“ a „velké“ kolonie),

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou,

— metody použité ke stanovení pH, osmolality, je-li test proveden, a v příslušných případech sraženiny.

Výsledky:

— počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,

— parametry toxicity (RTG pro MLA a RS pro TK6),

— známky srážení a čas jejich stanovení,

— počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu,

— počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,

— stanovení velikosti kolonií u negativních a pozitivních kontrol a v případě, že je zkoušená chemická látka pozitivní, alespoň jedna koncentrace a související četnosti mutací,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo) a pozitivní kontrole (koncentrace a rozpouštědla) s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami, počet zkoušek, z nichž vychází historické kontroly,

— statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty; a pro test MLA hodnocení GEF.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45, 2-3. 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (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 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) 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 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91–103.

(54) 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. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): s. 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupné na webových stránkách: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Chem. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

DEFINICE

Aneugen: Jakákoli chemická 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).

Mutageny substituce párů bází: Chemické látky, které způsobují substituci jednoho nebo více párů bází v DNA.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Účinnost klonování: Procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Klastogen: Jakákoli chemická látka nebo proces, které způsobují strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

Cytotoxicita: U zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního celkového růstu (RTG) nebo relativního přežití (RS) v testu MLA, respektive TK6.

Přímá mutace: Genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity nebo funkce kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: Chemické látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

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.

Mitotická rekombinace: Rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k indukci dvojných zlomů vláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

Mutagenní: Produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Četnost mutací (MF): Počet pozorovaných mutantních buněk dělený počtem životaschopných buněk.

Doba exprese fenotypu: Doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová vlastnost.

Relativní přežití: Relativní přežití se u TK6 používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to relativní účinnost klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po jejich expozici, upravená podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativní kontroly.

Relativní růst v suspenzi (RSG): V testu MLA se relativní celkový dvoudenní růst zkoušené kultury v suspenzi porovná s celkovým dvoudenním růstem negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem v suspenzi (Clive a Spector, 1975). RSG by měl zahrnovat relativní růst zkoušené kultury v porovnání s negativní kontrolou/kontrolou s rozpouštědlem v průběhu expozice.

Relativní celkový růst (RTG): Relativní celkový růst se u MLA používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to míra relativního (ke kontrole s vehikulem) růstu zkoušených kultur v průběhu expozice, ve fázi dvoudenní exprese a ve fázi selekce mutantních klonů. RSG každé zkoušené kultury se vynásobí relativní účinností klonování zkoušené kultury v době selekce mutantů a vyjadřuje se ve vztahu k účinnosti klonování negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem (Clive a Spector, 1975).

Jaterní frakce S9: Supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000g, tj. surový jaterní extrakt

Směs S9: Směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Růst v suspenzi (SG): Násobné zvýšení počtu buněk v průběhu expozice a fáze exprese v testu MLA. SG se vypočítá vynásobením násobného zvýšení v den 1 násobným zvýšením v den 2 u krátkodobé (3 nebo 4 hodiny) expozice. Jestliže se použije 24hodinová expozice, je SG násobné zvýšení v průběhu 24hodinové expozice vynásobené násobným zvýšením v dny exprese 1 a 2.

Kontrola s rozpouštědlem: Obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Neexponované kontroly: Neexponované/neošetřené kontroly jsou kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

Dodatek 2

VZORCE

CYTOTOXICITA

Pro obě verze testu MLA (s použitím agaru i mikrotitračních destiček)

Cytotoxicita je definována jako relativní celkový růst (RTG), který zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG) v průběhu dvoudenní exprese a relativní účinnost klonování (RCE) dosaženou v době selekce mutantů. RTG, RSG a RCE jsou vyjádřeny v procentech.

Výpočet RSG: Růst v suspenzi jedna (SG_1) je rychlost růstu mezi dnem 0 a dnem 1 (koncentrace buněk v den 1 / koncentrace buněk v den 0) a růst v suspenzi dva (SG_2) je rychlost růstu mezi dnem 1 a dnem 2 (koncentrace buněk v den 2 / koncentrace buněk v den 1). RSG je celkový růst SG (SG_1 x SG_2) pro exponovanou kulturu v porovnání s neexponovanou kulturou / kulturou s rozpouštědlem. To znamená: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] SG_1 se vypočítá z počáteční koncentrace buněk použité na začátku expozice buněk. Zahrnuje to případnou diferenciální cytotoxicitu, k níž dochází ve zkoušené kultuře (kulturách) v průběhu expozice buněk.

RCE je relativní účinnost klonování zkoušené kultury v porovnání s relativní účinností klonování neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem zjištěné v době selekce mutantů.

Relativní celkový růst (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

RELATIVNÍ PŘEŽITÍ (RS):

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %). Korekci ztráty buněk v průběhu expozice lze vypočítat jako:

$$\text{Adjusted CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

Relativní přežití u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

ČETNOST MUTACÍ PRO MLA I TK6

Četnost mutací (MF) je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu (CE_M) upraveno podle účinnosti klonování v neselektivním médiu v době selekce mutací (CE_V). To znamená MF = CE_M / CE_V. Výpočet těchto dvou účinností klonování je popsán níže pro metodu klonování s použitím agaru a metodu s použitím mikrodestiček.

Verze testu MLA s použitím agaru: Ve verzi testu MLA s použitím měkkého agaru se počet kolonií na destičce pro selekci mutantů (C_M) a počet kolonií na neselektované destičce nebo destičce pro účinnost klonování (životaschopný počet) (C_V) zjistí přímým spočítáním klonů. Když se umístí 600 buněk pro účinnost klonování (CE) na destičky pro selekci mutantů (CE_M) a neselektované destičky nebo destičky pro účinnost klonování (životaschopný počet) (CE_V) a 3 x 10^6 buněk se použije pro selekci mutantů,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verze testu MLA a TK6 s použitím mikrodestiček: Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se hodnoty C_M a C_V určí jako součin celkového počtu mikrodestiček (TW) a pravděpodobného počtu kolonií na jamku (P) na mikrotitračních destičkách.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od nulového výrazu Poissonova rozdělení (Furth et al., 1981) je P dáno vztahem

$$P = - \ln (EW / TW)$$

kde EW jsou prázdné jamky a TW je celkový počet jamek. Proto,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie vypočítají stejným způsobem s použitím příslušného počtu prázdných jamek pro malé a velké kolonie.

V testu TK6 vycházejí četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie z časně a pozdně se objevujících mutantů.

B.68 ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KRÁTKODOBOU EXPOZICI IN VITRO PRO IDENTIFIKACI i) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A ii) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 491 (2017). Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici (STE) je metoda *in vitro*, kterou lze použít za určitých okolností a se specifickými omezeními pro klasifikaci a označování nebezpečnosti chemických látek (látek a směsí), které vyvolávají vážné poškození očí, i chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky vyvolávající vážné poškození očí nebo mající dráždivé účinky na oči, jak je definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP) ([1]).

2. Po řadu let byl potenciál nebezpečnosti chemických látek pro oči posuzován primárně pomocí oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5 (8), ekvivalentní zkušební metodice OECD č. 405). Obecně se uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit oční zkoušku na králících *in vivo*, pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí / dráždivosti u různých tříd chemických látek. Oční zkouška na králících by však mohla být nahrazena strategickou kombinací alternativních zkušebních metod použitých v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení (2). Pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že budou mít vysoký potenciál dráždivosti nebo že budou vyvolávat závažné poškození očí, je navržen přístup shora dolů. Naopak přístup zdola nahoru je navržen pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že nebudou působit takové podráždění očí, aby to vyžadovalo klasifikaci. Ačkoli není zkušební metoda STE považována za úplnou náhradu očního testu *in vivo* na králících, je vhodná pro použití jako součást odstupňované strategie zkoušení pro klasifikaci a označování pro regulační účely, například v rámci přístupu shora dolů / zdola nahoru, aby bylo možné určit bez dalšího zkoušení i) chemické látky vyvolávající závažné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) a ii) chemické látky (s výjimkou vysoce těkavých látek a všech pevných chemických látek jiných než povrchově aktivních látek), které nevyžadují klasifikaci jako látky dráždivé pro oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 2 podle GHS OSN/CLP) (1)(2). U chemické látky, o níž se na základě použití zkušební metody STE nepředpokládá, že vyvolává vážné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) ani není klasifikována jako „bez kategorie podle GHS OSN/CLP" (nevyvolává vážné poškození očí ani podráždění očí), by však pro stanovení konečné klasifikace bylo nutné další zkoušení. Použití zkušební metody STE v rámci postupu „zdola nahoru" podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány. Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (14).

3. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopnosti vyvolávat toxicitu při použití zkušební metody s krátkodobou expozicí. Cytotoxický účinek chemických látek na epitelové buňky rohovky je důležitým způsobem účinku (MOA) vedoucím k poškození epitelu rohovky a podráždění očí. Životaschopnost buněk se ve zkušební metodě STE posuzuje kvantitativním měřením po extrakci soli modrého formazanu z buněk produkovaného živými buňkami enzymatickou konverzí vitálního barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid), které se také nazývá bromthiazolová modř (3). Zjištěná životaschopnost buněk se porovná s kontrolou s rozpouštědlem (relativní životaschopnost) a použije se na odhad potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oči. Zkoušená chemická látka je klasifikována jako kategorie 1 podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % menší nebo rovna (≤) 70 %. Naopak, u zkoušené chemické látky lze předpokládat klasifikaci bez kategorie podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % větší než (>) 70 %.

4. Termín „zkoušená chemická látka" se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí. Definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu, který vyvinula společnost Kao Corporation (4) a který byl validován ve dvou různých studiích: jednu studii provedl validační výbor Japonské společnosti pro alternativy experimentů na

([1]) 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.

zvířatech (JSAAE) (5) a druhou japonské středisko pro validaci alternativních metod (JaCVAM) (6). Vzájemné hodnocení provedl NICEATM/ICCVAM na základě zpráv o validační studii a všeobecných dokumentů o kontrole této zkušební metody (7).

6. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP (1), vykázala data zjištěná u 125 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 83 % (104/125), míru falešné pozitivity 1 % (1/86) a míru falešné negativity 51 % (20/39) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Zjištěná míra falešné negativity není v této souvislosti kriticky důležitá, protože všechny zkoušené chemické látky, které indukují životaschopnost buněk ≤ 70 % při 5 % koncentraci a > 70 % při 0,05 % koncentraci by byly následně zkoušeny dalšími náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo jako poslední možnost oční zkouškou *in vivo* na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů a v souladu se strategií postupného zkoušení a podle analýzy průkaznosti výsledků, která je v současnosti doporučena (1)(8). Zkoušeny byly hlavně jednosložkové látky, ačkoli určité omezené množství údajů existuje i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Když byla zkušební metoda STE použita na zjištění chemických látek klasifikovaných jako kategorie 1 GHS OSN, nevykazovala žádné jiné konkrétní nedostatky. Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny zkoušené chemické látky, přičemž životaschopnost buněk ≤ 70 % při koncentraci 5 % i 0,05 % by měla být považována za odpověď indukující vážné poškození očí, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN/CLP bez dalšího zkoušení.

7. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) nevyžadujících klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP), vykázala data zjištěná u 130 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 85 % (110/130), míru falešné negativity 12 % (9/73) a míru falešné pozitivity 19 % (11/57) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Pokud se z datového souboru vyloučí vysoce těkavé látky a pevné látky jiné než povrchově aktivní látky, celková přesnost se zlepší na 90 % (92/102), míra falešné negativity na 2 % (1/54) a míra falešné pozitivity na 19 % (9/48) (7). Potenciálním nedostatkem zkušební metody STE použité pro zjištění zkoušených chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), tedy je vysoká míra falešné negativity u i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek. Tyto chemické látky jsou ze sféry použitelnosti zkušební metody STE vyloučeny (7).

8. Kromě chemických látek uvedených v odstavcích 6 a 7 obsahuje datový soubor generovaný pomocí zkušební metody STE také interní údaje o 40 směsích, které při porovnání s Draizovou oční zkouškou *in vivo* vykázaly přesnost 88 % (35/40), míru falešné pozitivity 50 % (5/10) a míru falešné negativity 0 % (0/30) při predikci směsí, které nevyžadují klasifikaci podle klasifikačních systémů GHS OSN/CLP (9). Zkušební metoda STE tedy může být použita pro zjištění směsí klasifikovaných jako směsi bez kategorie GHS OSN/CLP při použití přístupu zdola nahoru s výjimkou pevných směsí jiných než směsí složených pouze z povrchově aktivních látek navíc k jejímu omezení u pevných látek. Dále směsi obsahující látky s tenzí par vyšší než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.

9. Zkušební metodu STE nelze použít pro identifikaci zkoušených chemických látek klasifikovaných jako látky kategorie 2 GHS OSN/CLP nebo kategorie 2A GHS OSN (podráždění očí) nebo kategorie 2B GHS OSN (mírné podráždění očí), a to vzhledem k značnému počtu chemických látek kategorie 1 GHS OSN/CLP podhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B a látek bez kategorie GHS OSN/CLP nadhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B (7). Pro tento účel může být nezbytné další zkoušení s použitím jiné vhodné metody.

10. Zkušební metoda STE je vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpuštěny nebo rovnoměrně suspendovány po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5 % dimethylsulfoxidu (DMSO) ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Zkušební metoda STE není vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou nerozpustné nebo které nelze rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5 % DMSO ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Použití minerálního oleje ve zkušební metodě STE je možné vzhledem ke krátkodobé expozici. Zkušební metoda STE je tedy vhodná pro predikci potenciálu nebezpečnosti zkoušených chemických látek nerozpustných ve vodě pro oči (např. mastné alkoholy nebo ketony s dlouhým řetězcem), pokud jsou mísitelné alespoň s jedním ze tří výše uvedených navrhovaných rozpouštědel (4).

11. Termín „zkoušená chemická látka" se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší ([1]), a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Zkušební metoda STE je zkouška *in vitro* založená na cytotoxicitě, která se provádí na konfluentní monovrstvě buněk rohovky králíka (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea – SIRC), které se kultivují na 96jamkové polykarbonátové mikrotitrační destičce (4). Po pětiminutové expozici zkoušené chemické látce se pomocí zkoušky MTT kvantitativně změří cytotoxicita jako relativní životaschopnost buněk SIRC (4). Snížená životaschopnost buněk se použije na predikci potenciálních nežádoucích účinků vedoucích k poškození oka.

13. Bylo hlášeno, že 80 % roztoku nakapaného do oka králíka se vyloučí přes spojivkový vak do tří až čtyř minut, zatímco více než 80 % roztoku nakapaného do lidského oka se vyloučí do jedné až dvou minut (10). Zkušební metoda STE se pokouší aproximovat tyto doby expozice a využít cytotoxicitu jako sledovanou vlastnost pro posouzení rozsahu poškození buněk SIRC po pětiminutové expozici zkoušené chemické látce.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

14. Dříve, než začnou laboratoře rutinně používat zkoušku STE popsanou v této zkušební metodě, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace jedenácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly celý rozsah odpovědí u závažného poškození očí nebo podráždění očí na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG 405) a klasifikačního systému GHS OSN (1). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a aby existovaly kvalitní údaje *in vitro* ze zkoušky STE (3). V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro*, pokud budou použita stejná kritéria jako kritéria zde popsaná.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Skupenství	Kat. GHS OSN/CLP *in vivo* ([2])	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/CLP
benzalkoniumchlorid (10 %, vodný)	8 001-54-5	oniová sloučenina	kapalina	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1

([1]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných zkušebních metodách používán výraz „zkoušená chemická látka" popisující to, co se zkouší, jednotněji.

Látka	CASRN	Třída chemických látek (1)	Skupenství	Kat. GHS OSN/CLP *in vivo* (2)	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/CLP
triton X-100 (100 %)	9 002-93-1	ether	kapalina	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1
kyselá červeň 92	18 472-87-2	heterocyklická sloučenina; sloučenina bromu; sloučenina chloru	pevná látka	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1
hydroxid sodný	1 310-73-2	zásada; anorganická chemická látka	pevná látka	kategorie 1 (3)	fyziologický roztok	kategorie 1
butyrolakton	96-48-0	lakton; heterocyklická sloučenina	kapalina	kategorie 2A (kategorie 2 v CLP)	fyziologický roztok	nelze předpovědět
oktan-1-ol	111-87-5	alkohol	kapalina	kategorie 2A/B (4)(kategorie 2 v CLP)	minerální olej	nelze předpovědět
cyklopentanol	96-41-3	alkohol; uhlovodík, cyklický	kapalina	kategorie 2A/B (5) (kategorie 2 v CLP)	fyziologický roztok	nelze předpovědět
2-ethoxyethyl-acetát	111-15-9	alkohol; ether	kapalina	bez kategorie	fyziologický roztok	bez kategorie
dodekan	112-40-3	uhlovodík, acyklický	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie
methyl(isobutyl)keton	108-10-1	keton	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie

Látka	CASRN	Třída chemických látek (1)	Skupenství	Kat. GHS OSN/CLP *in vivo* (2)	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/CLP
1,1-dimethylguanidin-sulfát	598-65-2	amidin; sloučenina síry	pevná látka	bez kategorie	fyziologický roztok	bez kategorie

(1) Chemické třídy byly přiřazeny s použitím informací získaných z předchozích publikací NICEATM, a pokud tyto informace nebyly k dispozici, s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH®) (přes ChemIDplus® [National Library of Medicine], k dispozici na http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), přičemž určení struktury bylo provedeno podle NICEATM.

(2) Na základě výsledků zkoušky na oku králíka *in vivo* (Pokyn OECD (TG) č. 405) a s použitím GHS OSN/CLP (1).

(3) Klasifikace jako kategorie 1 vychází z potenciálních leptavých účinků na kůži 100 % hydroxidu sodného (uvedeného na seznamu pokynu OECD TG 435 jako vhodná chemická látka s potenciálními leptavými účinky pro kůži) a z kritéria pro kategorii 1 podle GHS OSN/CLP (1).

(4) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 2 ze 6 oproti 4 ze 6 zvířat s účinky v den 7. Datový soubor *in vivo* zahrnoval 2 studie po 3 zvířatech. V jedné studii vykazovala dvě ze tří zvířat účinky v den 7, což si vyžádalo klasifikaci jako kat. 2A (11), zatímco ve druhé studii se všechny sledované vlastnosti u všech tří zvířat vrátily do dne 7 na skóre nula, což odpovídá klasifikaci 2B (12).

(5) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3 oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky a zčervenání spojivek u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 a skóre zčervenání spojivek 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 14 (11).

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

POSTUP

Příprava monovrstvy buněk

15. Zkušební metoda STE se používá s buněčnou linií z rohovky králíka SIRC. Doporučuje se, aby byly buňky SIRC pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur CCL60.

16. Buňky SIRC se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v kultivační lahvi obsahující kultivační médium, které sestává z Eaglova minimálního esenciálního média (MEM) doplněného 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 2 mM L-glutaminu, 50–100 jednotkami/ml penicilinu a 50–100 µg/ml streptomycinu. Buňky, které v kultivační lahvi splynuly, je třeba rozdělit pomocí roztoku trypsinu a kyseliny ethylendiamintetraoctové, s použitím nebo bez použití stěrky. Před použitím k rutinním zkouškám se buňky nechají rozmnožit (např. 2 až 3 pasáže) v kultivační láhvi, přičemž by neměly být pasážovány více než 25krát od rozmrazení.

17. Buňky připravené k použití ke zkoušce STE se poté upraví na vhodnou hustotou a nasadí do 96jamkových destiček. Doporučená hustota nasazování buněk je $6{,}0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány čtyři dny po nasazení, nebo $3{,}0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány pět dnů po nasazení, v 200 µl kultivačního média. Buňky použité ke zkoušce STE, které jsou nasazeny do kultivačního média ve vhodné hustotě, dosáhnou konfluence v době zkoušení více než 80 %, tj. čtyři nebo pět dnů od nasazení.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

18. Rozpouštědlem první volby pro ředění nebo rozpuštění chemických látek je fyziologický roztok. Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje nízkou rozpustnost nebo ji nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku, použije se jako rozpouštědlo druhé volby 5 % DMSO (CAS#67-68-5) ve fyziologickém roztoku. Pro zkoušené chemické látky, které nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku ani v 5 % DMSO ve fyziologickém roztoku, se jako rozpouštědlo třetí volby použije minerální olej (CAS#8042-47-5).

19. Zkoušené chemické látky se rozpustí nebo rovnoměrně suspendují ve zvoleném rozpouštědle na koncentraci 5 % (hmotnostních) a poté se dále ředí postupným desetinásobným ředěním na koncentraci 0,5 % a 0,05 %. Každá zkoušená chemická látka se zkouší v koncentraci 5 % i 0,05 %. Buňky kultivované v 96jamkové mikrotitrační destičce se exponují roztoku (nebo suspenzi) zkoušené chemické látky v množství 200 µl/jamku v koncentraci 5 % nebo 0,05 %, a to po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Zkoušené chemické látky (jednosložkové látky nebo vícesložkové látky či směsi) se považují za čisté látky a ředí se nebo suspendují podle této metody bez ohledu na čistotu.

20. Kultivační médium popsané v odstavci 16 se používá jako kontrola s médiem na každé destičce a při každém opakování. Kromě toho se na každé destičce a při každém opakování buňky exponují také vzorkům kontroly s rozpouštědlem. Bylo potvrzeno, že rozpouštědla uvedená v odstavci 18 nemají žádné nežádoucí účinky na životaschopnost buněk SIRC.

21. Ve zkušební metodě STE se na každé destičce a při každém opakování používá jako pozitivní kontrola 0,01 % laurylsíran sodný (SLS) ve fyziologickém roztoku. Aby bylo možné vypočítat životaschopnost buněk u pozitivní kontroly, musí každá destička při každém opakování zahrnovat také kontrolu s rozpouštědlem ve fyziologickém roztoku.

22. Aby bylo možné stanovit kompenzaci pro optickou hustotu, je třeba provést slepou zkoušku, přičemž tato slepá zkouška se provádí na jamkách obsahujících pouze fosfátový pufr, ale žádné kalcium a magnézium (PBS-) nebo buňky.

23. Každý vzorek (zkoušená chemická látka v koncentraci 5 % a 0,05 %, kontrola s médiem, kontrola s rozpouštědlem a pozitivní kontrola) je třeba zkoušet při každém opakování třikrát exponováním buněk 200 µl příslušné zkoušené nebo kontrolní látky po dobu pěti minut při pokojové teplotě.

24. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek nebo produktů nebo pro hodnocení relativního potenciálu podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měření životaschopnosti buněk

25. Po expozici se buňky dvakrát promyjí 200 µl PBS a přidá se 200 µl roztoku MTT (0,5 mg MTT/ml kultivačního média). Po dvouhodinové reakční době v inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2) se roztok MTT dekantuje, formazan MTT se extrahuje přidáním 200 µl 0,04 N kyseliny chlorovodíkové v isopropanolu po dobu 60 minut v temnu při pokojové teplotě a pomocí čtečky destiček se změří absorbance roztoku formazanu MTT při 570 nm. K interferenci zkoušených chemických látek s analýzou MTT (barvivy nebo přímými redukčními činidly MTT) dochází pouze, když se ve zkušebním systému ponechá po oplachu po expozici významné množství zkoušené chemické látky, což platí pro 3D tkáně rekonstruované lidské rohovky nebo rekonstruované lidské epidermis, ale neplatí pro 2D buněčné kultury používané pro zkušební metodu STE.

Interpretace výsledků a predikční model

26. Poté se použijí hodnoty optické hustoty (OD) dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku k výpočtu relativní životaschopnosti buněk vzhledem ke kontrole s rozpouštědlem, která je stanovena na úroveň 100 %. Relativní životaschopnost buněk se vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty zkoušené chemické látky optickou hustotou kontroly s rozpouštědlem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570} of\ test\ chemical) - (OD_{570} of\ blank)}{(OD_{570} solvent\ control) - (OD_{570} of\ blank)} \times 100$$

Podobně se relativní životaschopnost buněk každé kontroly s rozpouštědlem vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty každé kontroly s rozpouštědlem optickou hustotou kontroly s médiem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

27. Měla by být provedena tři nezávislá opakování, přičemž každé zahrnuje tři replikované jamky (tj. n = 9). Aritmetický průměr tří jamek pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolu s rozpouštědlem při každém nezávislém opakování se použije pro výpočet aritmetického průměru relativní životaschopnosti buněk. Ze tří nezávislých opakování se vypočítá konečný aritmetický průměr životaschopnosti buněk.

28. Dále jsou uvedeny hraniční hodnoty životaschopnosti buněk pro identifikaci zkoušených chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP) a zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP).

Tabulka 2

Prediktivní model zkušební metody STE

Životaschopnost buněk		Klasifikace GHS OSN/CLP	Použitelnost
při 5 %	při 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	bez kategorie	látky a směsi, s výjimkou: i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa ([69]) a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek
≤ 70 %	> 70 %	nelze předpovědět	nepoužije se
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorie 1	látky a směsi ([2])

([69]) Směsi obsahující látky s tlakem výparů vyšším než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.

([2]) Na základě výsledků získaných zejména ze zkoušek jednosložkových látek, ačkoli omezené údaje existují i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

Kritéria přijatelnosti

29. Výsledky zkoušky se považují za přijatelné, když jsou splněna všechna následující kritéria:

a) Optická hustota kontroly s médiem (exponované kultivačnímu médiu) by měla být po odečtení optické hustoty slepého pokusu 0,3 nebo vyšší.

b) Životaschopnost kontroly s rozpouštědlem by měla být 80 % nebo vyšší ve vztahu ke kontrole s médiem. Pokud se při každém opakování používají kontroly s více rozpouštědly, každá z těchto kontrol by měla vykazovat životaschopnost buněk větší než 80 %, aby byly vhodné pro chemické látky zkoušené těmito rozpouštědly.

c) Životaschopnost buněk zjištěná při pozitivní kontrole (0,01 % SLS) by měla být mezi dvěma směrodatnými odchylkami od historické střední hodnoty. Horní a dolní mez přijatelnosti pro pozitivní kontrolu je třeba často aktualizovat, tj. každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Pokud laboratoř neprovedla dostatečný počet experimentů, aby mohla stanovit statisticky robustní distribuci pozitivních kontrol, je přijatelné, aby byla použita horní a dolní mez přijatelnosti stanovená subjektem, který metodu vyvinul, tj. mezi 21,1 % a 62,3 % podle historických dat laboratoře, přičemž v průběhu prvních rutinních zkoušek se stanoví interní distribuce.

d) Směrodatná odchylka konečné životaschopnosti buněk odvozená ze tří nezávislých opakování by měla být menší než 15 % pro koncentraci 5 % i 0,05 % zkoušené chemické látky.

Není-li jedno nebo několik těchto kritérií splněno, měly by se výsledky zlikvidovat a provést další tři nezávislá opakování.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

30. Vykazují se údaje za každou jednotlivou jamku (např. hodnoty životaschopnosti buněk) z každého opakování, jakož i celková střední hodnota, směrodatná odchylka a klasifikace.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a látky pro kontrolu

— Jednosložková látka: chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, registrační číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Podmínky a postupy zkušební metody

— Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkušební metody,

— použitá buněčná linie, její zdroj, počet pasáží a konfluence buněk použitých ke zkoušení,

— podrobnosti o použitém zkušebním postupu,

— počet opakování a použitých replik,

— koncentrace zkoušených chemických látek (pokud se liší od doporučených),

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku,

— délka expozice zkoušené chemické látce (pokud se liší od doporučené),

— popis všech úprav zkušebního postupu,

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— odkaz na dosavadní střední hodnoty pozitivních kontrol a směrodatnou odchylku (SD):

— prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkušební metody (např. zkoušením vhodných látek) nebo prokázání reprodukovatelného provedení této zkušební metody v průběhu doby.

Výsledky

— Pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku a pro každou zkoušenou koncentraci je třeba v tabulkové formě uvést jednotlivé hodnoty optické hustoty každé replikované jamky, aritmetický průměr hodnot optické hustoty pro každé nezávislé opakování, % životaschopnosti buněk pro každé nezávislé opakování a konečný aritmetický průměr % životaschopnosti buněk a směrodatnou odchylku ze tří opakování,

— výsledky z kontroly s médiem, kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly prokazující vhodná kritéria přijatelnosti studie,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— celková odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na webových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al*. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. Chem. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupné na webových stránkách: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitola B.5 této přílohy: Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (13).

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích; a v) známou sílu v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušené chemické látky, u níž se předpokládá, že ji není nutné klasifikovat jako látku mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Podráždění očí: Vyvolání změny na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, která je plně vratná do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a kategorie 2 GHS OSN/CLP.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Kontrola s médiem: Neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

OD: Optická hustota.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

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 (10).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (13).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (10).

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a kategorie 1 GHS OSN/CLP.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává s exponovanými zkoušenými chemickými látkami a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (13).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: Nazývané též povrchově aktivní látka, je to chemická látka, jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako surfaktant.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Strategie stupňovitého zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Přístup „shora dolů“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 GHS OSN/CLP: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (nebo 2A nebo 2B GHS OSN).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

B.69 ZKUŠEBNÍ METODA S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO LIDSKÉ ROHOVCE (RhCE) PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 492 (2017). *Vážné poškození očí* znamená vznik poškození tkáně oka nebo závažné zhoršení zraku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dnů po aplikaci, jak je definováno v globálně harmonizovaném systému klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN) (1) a v nařízení Evropského unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]). Rovněž podle GHS OSN a CLP znamená *podráždění očí* vznik změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Zkoušené chemické látky vyvolávající vážné poškození oka jsou klasifikovány jako látky kategorie 1 GHS OSN a CLP, zatímco zkoušené chemické látky vyvolávající podráždění oka jsou klasifikovány jako kategorie 2 GHS OSN a CLP. Zkoušené chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jsou definovány jako chemické látky, které nesplňují požadavky pro klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN a CLP, tj. označují se jako chemické látky bez kategorie GHS OSN a CLP.

2. Posuzování vážného poškození oka / podráždění oka bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.5 (2)). Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (39).

3. Tato zkušební metoda popisuje postup *in vitro*, který umožňuje určení chemických látek (látek a směsí), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Využívá rekonstruovaného epitelu podobného lidské rohovce (RhCE), který věrně napodobuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti epitelu lidské rohovky. Byly validovány čtyři další zkušební metody *in vitro*, které jsou považovány za vědecky platné a byly přijaty jako zkušební metody B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) a B.68 (6) pro zkoumání účinků na lidské zdraví, a to vážného poškození oka / podráždění oka.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje dvě validované zkoušky využívající komerčně dostupné modely RhCE. Validační studie k posouzení podráždění oka / vážného poškození oka byly provedeny (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) s použitím zkoušek na podráždění oka (EIT) EpiOcular™ a SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE). Každá z těchto zkoušek, které se v dalším textu nazývají validované referenční metody – VRM 1 respektive VRM2, využívá jako zkušební systém komerčně dostupné tkáňové konstrukce RhCE. Na základě těchto validačních studií a jejich nezávislého vzájemného hodnocení (9)(12) byl vyvozen závěr, že zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE dokážou správně určit chemické látky (látky i směsi), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle GHS OSN, a tyto zkoušky byly doporučeny jako vědecky platné pro tento účel (13).

5. V současnosti se obecně uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit Draizeovu oční zkoušku *in vivo* (2)(14), pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí/dráždivosti u různých tříd chemických látek. Draizeova oční zkouška (15) by však mohla být zcela nahrazena strategickými kombinacemi několika alternativních zkušebních metod v rámci strategií (odstupňovaného) zkoušení, jako je přístup zdola nahoru / shora dolů. Postup „zdola nahoru“ (15) má být použit, pokud se na základě existujících informací očekává, že chemická látka nevyvolává tak intenzivní podráždění oka, aby vyžadovala klasifikaci, zatímco postup „shora dolů“ (15) se má použít, jestliže se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka vyvolává závažné poškození oka. Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE se doporučují použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle systému GHS OSN (bez kategorie), bez dalšího zkoušení, a to v rámci strategie zkoušení, jako je přístup zdola nahoru, jak navrhuje Scott *et al.*, například jako první krok v přístupu zdola nahoru

([1]) 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.

nebo jako jeden z posledních kroků v přístupu shora dolů (15). Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE však nejsou určeny pro rozlišení látek kategorie 1 GHS OS/CLP (vážné poškození oka) od látek kategorie 2 GHS OS/CLP (podráždění oka). Toto rozlišení bude třeba řešit dalším stupněm strategie zkoušení (15). Zkoušená chemická látka, která je pomocí zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ EIT nebo SkinEthic™ HCE určena jako látka vyžadující klasifikaci z důvodu podráždění oka / vážného poškození oka, tedy bude vyžadovat další zkoušení (*in vitro* anebo *in vivo*), aby bylo možné stanovit konečný závěr (bez kategorie, kategorie 2 nebo kategorie 1 GHS OSN/CLP), a to pomocí např. zkušební metody B.47, B.48, B.61 nebo B.68.

6. Účelem této zkušební metody je popsat postup používaný k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopností vyvolávat toxicitu v tkáňové konstrukci RhCE, měřenou analýzou MTT (16) (viz odstavec 21). Životaschopnost tkáně RhCE po expozici zkoušené chemické látce se určuje porovnáním s tkáněmi ošetřenými negativní kontrolní látkou (% životaschopnosti) a poté se používá k predikci potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oko.

7. K dispozici jsou standardy funkčnosti (17), které usnadní validaci nových nebo pozměněných zkoušek *in vitro* využívajících RhCE, obdobných zkouškám na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE, v souladu se zásadami pokynu OECD č. 34 (18), a které umožní včas provést změnu pokynu OECD pro zkoušení č. 492, aby do něj mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů bude podle postupu dohodnutého v rámci OECD zaručeno pouze u zkušebních metod validovaných podle těchto standardů funkčnosti, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do odpovídajícího pokynu ke zkoušení.

DEFINICE

8. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

9. Tato zkušební metoda vychází z komerčních trojrozměrných tkáňových konstrukcí RhCE, které se vyrábějí s využitím primárních lidských epidermálních keratinocytů (tj. EpiOcular™ OCL-200), nebo imortalizovaných lidských buněk epitelu rohovky (tj. SkinEthic™ HCE/S). Tkáňové konstrukce EpiOcular™ OCL-200 a SkinEthic™ HCE/S RhCE jsou podobné trojrozměrné struktuře rohovkového epitelu *in vivo* a vyrábějí se s použitím buněk zájmových druhů (19)(20). Tyto zkoušky navíc přímo měří cytotoxicitu v důsledku průniku chemické látky přes rohovku a vznik poškození buněk a tkání; cytotoxická odpověď poté určuje celkový výsledek vážného poškození oka / podráždění oka *in vivo*. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku (viz odstavec 20), ale cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne primární, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně.

10. Ve validační studii k této zkušební metodě byla zkoušena široká škála chemických látek zahrnujících nejrůznější chemické druhy, chemické třídy, molekulové hmotnosti, logP, chemické struktury atd. Validační databáze zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ obsahovala celkem 113 chemických látek zahrnujících 95 různých organických funkčních skupin podle analýzy OECD QSAR (8). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 3 homopolymerů, 5 kopolymerů a 10 kvazipolymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 113 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 13 kapalin kategorie 1, 15 pevných látek kategorie 1, 6 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 7 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 27 kapalin bez kategorie a 28 pevných látek bez kategorie (8). Validační databáze zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE obsahovala celkem 200 chemických látek zahrnujících 165 různých organických funkčních skupin (8)(10)(11). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 10 polymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 200 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 27 kapalin kategorie 1, 24 pevných látek kategorie 1, 19 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 9 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 50 kapalin bez kategorie a 53 pevných látek bez kategorie (10)(11).

11. Tato zkušební metoda je použitelná pro látky a směsi a pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly nebyly ve validační studii hodnoceny. Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití techniky RhCE teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

12. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitém pro kvantifikaci formazanu MTT (viz odstavce 36–42).

13. Výsledky získané v předběžné validační studii (21)(22) a v plné validační studii (8)(10)(11) prokázaly, že obě zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT i SkinEthic™ HCE jsou přenosné do laboratoří, které doposud tyto analýzy neprováděly, a také že jsou reprodukovatelné v rámci laboratoře i mezi laboratořemi. Podle těchto studií je míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze od zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ očekávat na základě údajů o 113 chemických látkách, řádově 95 % v rámci laboratoří a 93 % mezi laboratořemi. Míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze očekávat od zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE na základě údajů o 120 chemických látkách, je řádově 92 % v rámci laboratoří a 95 % mezi laboratořemi.

14. Zkoušku na podráždění oka EpiOcular™ lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (8) má zkouška na podráždění oka EpiOcular™ celkovou přesnost 80 % (podle 112 chemických látek), citlivost 96 % (podle 57 chemických látek), míru falešné negativity 4 % (podle 57 chemických látek), specifičnost 63 % (podle 55 chemických látek) a míru falešné pozitivity 37 % (podle 55 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Studie, v níž bylo zkoušeno 97 kapalných agrochemických přípravků ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™, prokázala podobnou výkonnost zkušební metody u tohoto druhu směsí, jaká byla získána ve validační studii (23). 97 přípravků bylo rozděleno takto: 21 kategorie 1, 19 kategorie 2A, 14 kategorie 2B a 43 bez kategorie, klasifikováno podle klasifikačního systému GHS OSN na základě údajů z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14). Byla dosažena celková přesnost 82 % (podle 97 přípravků), citlivost 91 % (podle 54 přípravků), míra falešné negativity 9 % (podle 54 přípravků), specifičnost 72 % (podle 43 přípravků) a míra falešné pozitivity 28 % (podle 43 přípravků) (23).

15. Zkoušku na podráždění očí SkinEthic™ HCE lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (10)(11) má zkouška na podráždění oka SkinEthic™ HCE celkovou přesnost 84 % (podle 200 chemických látek), citlivost 95 % (podle 97 chemických látek), míru falešné negativity 5 % (podle 97 chemických látek), specifičnost 72 % (podle 103 chemických látek) a míru falešné pozitivity 28 % (podle 103 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP.

16. Míry falešné negativity zjištěné u obou zkoušek RhCE u látek nebo směsí spadají do 12 % celkové pravděpodobnosti, že chemické látky jsou při opakovaných testech v Draizově oční zkoušce *in vivo* identifikovány jako kategorie 2 podle GHS OSN a CLP nebo bez kategorie podle GHS OSN a CLP; je to způsobeno inherentní variabilitou metody v rámci zkoušky (24). Míry falešné pozitivity zjištěné u obou zkušebních metod RhCE u látek nebo směsí nejsou u této zkušební metody zásadně důležité, neboť všechny zkoušené chemické látky, které vykazují životaschopnost tkáně rovnou nebo nižší než stanovené mezní hodnoty (viz odstavec 44), budou vyžadovat další zkoušení pomocí jiných

zkušebních metod *in vitro* nebo jako poslední možnost zkoušku na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu založeného na průkazných důkazech. Tyto zkušební metody lze použít pro všechny druhy chemických látek, přičemž negativní výsledek by měl být uznán pro neklasifikování chemické látky jako látky mající dráždivé účinky na oči a vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN a CLP). Použití zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ a SkinEthic™ HCE podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány.

17. Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišit mezi podrážděním oka / vratnými účinky na oko (kategorie 2) a vážným poškozením oka / nevratnými účinky na oko (kategorie 1) podle definice GHS OSN a CLP, ani mezi látkami vyvolávajícími podráždění oka (volitelná kategorie 2A) a látkami vyvolávajícími mírné podráždění oka (volitelná kategorie 2B) podle definice GHS OSN (1). Pro tyto účely je nutné další zkoušení s použitím jiných zkušebních metod *in vitro*.

18. Termín „zkoušená chemická látka" se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, ([2]) a netýká se použitelnosti zkušební metody RhCE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

PRINCIP ZKOUŠKY

19. Zkoušená chemická látka se aplikuje lokálně na minimálně dvě trojrozměrné konstrukce tkáně RhCE a po expozici a inkubační době po ošetření se změří životaschopnost tkáně. Tkáně RhCE jsou rekonstruovány z primárních lidských epidermálních keratinocytů nebo lidských imortalizovaných buněk epitelu rohovky, které byly kultivovány po několik dnů, aby vytvořily stratifikovaný, vysoce diferencovaný dlaždicový epitel morfologicky podobný epitelu, který se nachází v lidské rohovce. Tkáňová konstrukce EpiOcular™ RhCE sestává alespoň ze 3 životaschopných vrstev buněk a nekeratinizovaného povrchu vykazujícího strukturu podobnou rohovce, která je analogická struktuře *in vivo*. Tkáňová konstrukce SkinEthic™ HCE RhCE sestává alespoň ze 4 životaschopných vrstev buněk, včetně cylindrických bazálních buněk, přechodových křídlových buněk a povrchových dlaždicových buněk, podobných buňkám normálního lidského epitelu rohovky (20) (26).

20. Chemicky vyvolané vážné poškození očí / podráždění očí, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek, je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemické látky přes rohovku anebo spojivku a vznikem poškození buněk. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku, včetně: lýzy buněčné membrány (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel); koagulace makromolekul (zejména bílkovin) (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel, alkalických látek a kyselin); saponifikace lipidů (např. působením alkalických látek); a alkylace nebo jiných kovalentních interakcí s makromolekulami (např. působením bělidel, peroxidů a alkylačních látek) (15)(27)(28). Bylo však prokázáno, že cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne hlavní, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně (29)(30). Kromě toho potenciál chemické látky vyvolat vážné poškození oka / podráždění oka je v zásadě určen rozsahem počátečního poranění (31), které koreluje s rozsahem odumření buněk (29) a s rozsahem následných odpovědí a konečných výsledků (32). Slabě dráždivé látky tak obvykle zasáhnou pouze povrchový epitel rohovky, mírně a středně dráždivé látky poškozují zásadně epitel a povrchové vrstvy stromatu a silně dráždivé látky poškozují epitel, hluboké vrstvy stromatu a někdy i endotel rohovky (30)(33). Měření životaschopnosti tkáňové konstrukce RhCE po lokální expozici zkoušené chemické látce za účelem určení chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající vážné poškození oka / podráždění oka (bez kategorie podle GHS OSN a CLP), vychází z předpokladu, že všechny chemické látky vyvolávající vážné poškození oka nebo podráždění oka vyvolají cytotoxicitu v epitelu rohovky anebo ve spojivce.

([2]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka" popisující to, co se zkouší, jednotněji.

21. Životaschopnost tkáně RhCE se klasicky měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid; číslo CAS 298–93-1] vitálníni buňkami tkáně na sůl modrého formazanu MTT, jehož množství se změří po extrakci z tkání (16). Chemické látky, které nevyžadují klasifikaci a označení podle GHS OSN / CLP (bez kategorie), se určují jako látky, které nesnižují životaschopnost tkáně pod stanovenou mez (tj. životaschopnost tkáně > 60 % ve zkouškách EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EITL ([3]), nebo > 50 % ve zkouškách na dráždění oka SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (viz odstavec 44).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

22. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkoušky RhCE pro regulační účely, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správnou predikcí patnácti vhodných chemických látek uvedených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány z chemických látek použitých ve validačních studiích validovaných referenčních metod (8)(10)(11). Výběr zahrnuje pokud možno chemické látky, které: i) zahrnují různá skupenství; ii) celý rozsah odpovědí *in vivo* na vážné poškození očí / podráždění očí na základě kvalitních výsledků získaných v referenční oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) a klasifikačního systému GHS OSN (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo bez kategorie) (1) a klasifikačního systému CLP (tj. kategorie 1, 2 nebo bez kategorie); iii) zahrnují různé faktory *in vivo* důležité pro klasifikaci (24)(25); iv) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii (8)(10)(11); v) zahrnují správné a široké zastoupení organických funkčních skupin (8)(10)(11); vi) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány (8)(10)(11); vii) jsou zabarvené anebo přímo redukují MTT; viii) mají reprodukovatelné výsledky ve zkušebních metodách RhCE v průběhu validace; ix) byly správně predikovány zkušebními metodami RhCE v průběhu validace; x) zahrnují celý rozsah odpovědí *in vitro* na základě kvalitních údajů ze zkušebních metod RhCE (0 až 100 % životaschopnost); xi) jsou komerčně dostupné; a xii) nejsou spojeny s příliš vysokými pořizovacími náklady a/nebo náklady na likvidaci odpadu. V situacích, kdy uvedená chemická látka není k dispozici nebo ji nelze použít z jiných oprávněných důvodů, může být použita jiná chemická látka splňující výše popsaná kritéria, např. některá z chemických látek použitých při validaci validované referenční metody. Tyto změny by však měly být odůvodněny.

Tabulka 1

Seznam vhodných chemických látek

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina ([1])	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) ([2])	Životaschopnost VRM2 (%) ([3]) Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.	Kategorie *in vivo* 1 ([4])
Methylthioglykolát								
2 365-48-2	ester kyseliny karboxylové; thioalkohol	K	10,9 - ± 6,4	5,5 ± 7,4	nelze předpovědět	A (silně)	N	Hydroxyethylakrylát
818-61-1	akrylát;	alkohol	K	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	nelze předpovědět	N	N
2,5-dimethyl-2,5-hexandiol	110-03-2	alkohol	PL	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
Šťavelan sodný	62-76-0	kyselina oxokarboxylová	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	nelze předpovědět	N	N
Kategorie in vivo 2A ([4])								
2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid, N,N″-bis(4-chlorofenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonát (20 %, vodný) ([6])	18 472-51-0	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; dihydroxylová skupina; guanidin	K	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	nelze předpovědět	N	A (slabě)

([3]) EITL: zkouška na podráždění oka pro kapaliny v případě SkinEthic™ HCE.
([4]) EITS: zkouška na podráždění oka pro pevné látky v případě SkinEthic™ HCE.

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina (1)	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) (2)	Životaschopnost VRM2 (%) (3) Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.	Kategorie *in vivo* 1 (4)
Benzoan sodný	532-32-1	aryl; karboxylová kyselina	PL	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
***Kategorie in vivo* 2B** (4)								
Diethyl-toluamid	134-62-3	benzamid	K	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	nelze předpovědět	N	N
2,2-dimethyl-3-methylenebicyklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, rozvětvený s terciárním uhlíkem; alken; bicykloheptan; můstky propojené cyklické uhlovodíky; cykloalkan	PL	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	nelze předpovědět	N	N
Bez kategorie in vivo (4)								
1-ethyl-3-methylimidazol ethylsufát	3425 73-75-5	alkoxy; amonná sůl; aryl; imidazol; síran	K	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	bez kat.	N	N
Dikaprylylether	629-82-3	alkoxy; ether	K	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	bez kat.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	alkoxy; benzodioxol; benzyl; ether	K	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	bez kat.	N	N
Polyethylenglykol (PEG-40) hydrogenovaný ricinový olej	61788-85-0	acylal; alkohol; allyl; ether	viskózní	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	bez kat.	N	N
1-(4-chlorfenyl)-3-(3,4-dichlorfenyl) močovina	101-20-2	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; deriváty močoviny	PL	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	bez kat.	N	N
2,2′-methylen-bis-[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol]	1035 97-45-1	alkan, rozvětvený s kvartérním uhlíkem; kondenzovaná karbocyklická aromatická látka; kondenzované nasycené heterocykly; prekurzorové chinoidní sloučeniny; terc-butanol	PL	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	bez kat.	N	N

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina (1)	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) (2)	Životaschopnost VRM2 (%) (3) Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.	Kategorie *in vivo* 1 (4)
Tetrafluoroboritan draselný	14 075-53-7	anorganická sůl	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	bez kat.	N	N

Zkratky:

CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); GHS OSN = Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (1); VRM1 = validovaná referenční metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validovaná referenční metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Barevná interf. = měření barevné interference se standardní absorbancí (optická hustota (OD)) formazanu MTT.

(1) Organická funkční skupina stanovena podle vnořené analýzy pomocí souboru nástrojů OECD Toolbox 3.1 (8).

(2) Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™ při validační studii podráždění oka EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

(3) Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka SkinEthic™ HCE EIT při validační studii (10)(11).

(4) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5/pokyn OECD č. 405) (2)(14) a s použitím GHS OSN.

(5) Podle výsledků zjištěných ve studii zkušební strategie *in vitro* na podráždění oka CEFIC CONsortium (CON4EI).

(6) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3 oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 9.

23. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili bariérové vlastnosti tkání uvedené výrobcem tkáňové konstrukce RhCE (viz odstavce 25, 27 a 30). To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkouška úspěšně zavedena a je získána a prokázána způsobilost správně ji používat, není nutno běžně provádět takové ověřování. Při běžném používání zkoušky se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

POSTUP

24. Zkoušky, které v současné době zahrnuje tato zkušební metoda, jsou vědecky platné zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCET (9)(12)(13), nazývané validovaná referenční metoda (VRM1, respektive VRM2). K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro zkušební metody RhCE, které by měly být používány pro provádění a využívání těchto zkušebních metod v laboratoři (34)(35). V následujících odstavcích a v dodatku 2 je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušek RhCE.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY RHCE

Obecné podmínky

25. Na rekonstrukci trojrozměrné epitelové tkáně podobné rohovce, která by se měla skládat z postupně stratifikovaných, nikoli však kornifikovaných buněk, se používají příslušné lidské derivované buňky. Tkáňová konstrukce RhCE se připravuje ve vložkách s porézní syntetickou membránou, přes kterou mohou do buněk procházet živiny. V rekonstruovaném epitelu podobném rohovce by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných, nekeratinizovaných epitelových buněk. Tkáňová konstrukce RhCE by měla mít epitelový povrch v přímém kontaktu se vzduchem, aby byla možná přímá lokální expozice zkoušených chemických látek způsobem podobným tomu, jak by byl epitel rohovky exponován *in vivo*. Tkáňová konstrukce RhCE by měla tvořit funkční bariéru s dostatečnou robustností, aby odolala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. přípravku Triton X-100 nebo dodecylsulfátu sodného (SDS). Bariérová funkce by měla být prokázána a může být hodnocena stanovením doby expozice potřebné ke snížení životaschopnosti tkáně o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční látky v pevně stanovené koncentraci (např. 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100) nebo v koncentraci, při níž referenční látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice 50 µl SDS) (viz odstavec 30). Zadržovací vlastnosti tkáňové konstrukce RhCE by měly zabránit průchodu zkoušené chemické látky kolem okraje životaschopné tkáně, což by mohlo vést k nesprávnému modelování expozice rohovky. Lidské derivované buňky použité k vytvoření tkáňové konstrukce RhCE by neměly být kontaminovány bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy. Dodavatel by měl kontrolovat sterilitu tkáně rekonstrukce, zda není kontaminována houbami a bakteriemi.

Funkční podmínky

Životaschopnost

26. K určení míry životaschopnosti se používá zkouška MTT (16). Vitální buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření

absorbance (optické hustoty (OD)) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Uživatelé tkáňové konstrukce RhCE by měli zajistit, aby každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro validované referenční metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. V závěrečné zprávě je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolní látkou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti tkáně) po dobu trvání zkušební doby expozice. Podobný postup by měl používat výrobce tkání v rámci řízení kvality při propouštění šarží tkání, ale v tomto případě mohou platit jiná kritéria přijatelnosti než kritéria uvedená v tabulce 2. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody QC) stanoví subjekt, který model RhCE vyvinul nebo dodává.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly (pro uživatele testu)

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) V této mezi přijatelnosti je uvažována možnost delší doby přepravy/skladování (např. > 4 dny), která prokazatelně nemá vliv na účinnost zkušební metody (37).

Bariérová funkce

27. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být dostatečně silná a robustní, aby odolávala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, podle odhadu na základě hodnoty ET_{50} (např. Triton X-100) nebo IC_{50} (SDS) (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použité tkáňové konstrukce RhCE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhCE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 30).

Morfologie

28. Histologické vyšetření tkáňové konstrukce RhCE by mělo prokázat strukturu podobnou epitelu lidské rohovky (včetně alespoň 3 vrstev životaschopných epitelových buněk a nekeratinizovaného povrchu). Pro validované referenční metody stanovil vhodnou morfologii vývojář/dodavatel, a proto ji uživatel zkušební metody nemusí znovu prokazovat při každé použité šarži tkáně.

Reprodukovatelnost

29. Výsledky zkušební metody za použití pozitivních a negativních kontrol by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

30. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být použita pouze v případě, že subjekt, který ji vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria životaschopnosti (odstavec 26) a bariérové funkce (odstavec 27). Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro bariérové funkce měřené podle hodnoty ET_{50} nebo IC_{50} (viz odstavce 25 a 26) stanoví vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE. Rozsah přijatelnosti hodnot ET_{50} a IC_{50} použitý jako kritérium řízení kvality pro propouštění šarží u vývojáře/dodavatele tkáňových konstrukcí RhCE (použitých ve validovaných referenčních metodách) je uveden v tabulce 3. Údaje prokazující shodu se všemi výrobními kritérii pro propuštění by měl vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE poskytnout uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci chemických látek, které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN/CLP, lze akceptovat pouze výsledky získané u tkání splňujících všechna tato výrobní kritéria pro propuštění.

Tabulka 3

Kritérium kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (obj.) Tritonu X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30minutová expozice 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

31. Pro každou zkoušenou látku a každou kontrolní látku by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro kapalné zkoušené chemické látky a jeden pro pevné zkoušené chemické látky (34)(35). Před aplikací zkoušených chemických látek u obou metod a protokolů by měl být povrch tkáňové konstrukce zvlhčen Dulbeccovým fosfátovým pufrem bez vápníku a hořčíku (DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}), aby se napodobily vlhké podmínky lidského oka. Ošetření tkání se zahajuje expozicí zkoušené chemické látce (látkám) a kontrolní látkám. U obou zkušebních protokolů v obou validovaných referenčních metodách je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené chemické látky nebo kontrolní látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epitelu, a současně se vyhnout nekonečné dávce (viz odstavce 32 a 33) (dodatek 2).

32. Se zkoušenými chemickými látkami, které lze pipetovat při teplotě 37 °C nebo při nižších teplotách (v případě potřeby pomocí objemové pipety), se ve validovaných referenčních metodách nakládá jako s kapalinami, jinak by se s nimi mělo nakládat jako s pevnými látkami (viz odstavec 33). Ve validovaných referenčních metodách se kapalná zkoušená chemická látka rovnoměrně rozprostře na povrch tkáně (tj. aplikace minimálně 60 µl/cm^2) (viz dodatek 2, (33)(34)). V maximální možné míře by měly být vyloučeny kapilární jevy (účinky povrchového napětí), k nimž může dojít v důsledku malých objemů aplikovaných na vložku (na povrch tkáně), aby bylo zaručeno správné dávkování na tkáň. Tkáně ošetřené kapalnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po dobu 30 minut při standardních kultivačních podmínkách (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativní vlhkost). Na konci expoziční doby je nutno kapalnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě (aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě. Pouze u VMR1 platí poexpoziční inkubační doba v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).

33. Se zkoušenými chemickými látkami, které nelze pipetovat při teplotách do 37 °C, se ve validovaných referenčních metodách zachází jako s pevnými látkami. Množství aplikované zkoušené chemické látky by mělo být dostatečné, aby pokrylo celý povrch tkáně, tj. mělo by být aplikováno minimálně 60 mg/cm^2 (dodatek 2). Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Tkáně ošetřené pevnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po stanovenou dobu (v závislosti na použité validované referenční metodě) při standardních kultivačních podmínkách (viz dodatek 2, (34)(35)). Na konci expoziční doby je nutno pevnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě (aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě, a poexpoziční inkubace v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).

34. Do každého provedení zkoušky by se měly zařadit souběžné negativní a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (stanovená při negativní kontrole) a citlivost (stanovená při pozitivní kontrole) tkání jsou v rámci rozpětí přijatelnosti definovaného podle dosavadních hodnot. Souběžná negativní kontrola poskytuje také výchozí hodnotu (100 % životaschopnost tkáně) pro výpočet relativní percentuální životaschopnosti tkání ošetřených zkoušenou chemickou látkou (%$Viability_{test}$). Doporučenou látkou pro pozitivní kontrolu, která se má používat u těchto validovaných referenčních metod, je čistý methyl-acetát (CAS č. 79-20-9, komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich, kat. č. 45997; kapalný). Doporučenými látkami pro negativní kontrolu, které se mají používat u VRM1 a VRM2, je ultračistá H_2O, respektive DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Tyto kontrolní látky byly použity ve validačních studiích validovaných referenčních metod a většina dosavadních údajů se týká právě těchto látek. Použití vhodných alternativních látek pro pozitivní nebo negativní kontrolu by mělo být adekvátně vědecky odůvodněno. Negativní a pozitivní kontroly by měly být zkoušeny podle stejného protokolu (protokolů), jako byly protokoly použité pro zkoušené chemické látky zařazené do provedení zkoušky (tj. pro kapaliny anebo pevné látky). Po jejich aplikaci by měla následovat experimentální expozice, oplach, poexpoziční ponoření, případně poexpoziční inkubace, jak je popsáno pro kontroly prováděné souběžně u kapalných zkoušených chemických látek (viz odstavec 32) nebo pro kontroly prováděné souběžně u pevných zkoušených chemických látek (viz odstavec 33) před provedením analýzy MTT (viz odstavec 35) (34)(35). Postačí jedna sada negativních a pozitivních kontrol pro všechny zkoušené chemické látky stejného skupenství (kapaliny nebo pevné látky) zařazené do stejného provedení zkoušky.

Měření životaschopnosti tkání

35. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda (16), která by se měla používat k měření životaschopnosti tkání podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové konstrukce. Analýza MTT se provádí okamžitě po poexpoziční inkubační době. Ve validovaných referenčních metodách se vzorek tkáňové konstrukce RhCE vloží do 0,3 ml roztoku MTT v koncentraci 1 mg/ml na dobu 180 ± 15 min při standardních kultivačních podmínkách. Životaschopné buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu MTT. Vysrážený modrý formazan MTT se poté z tkáně extrahuje pomocí příslušného množství isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla) (34)(35). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami by měly být extrahovány z horní i dolní části tkání, zatímco tkáně testované pevnými zkoušenými chemickými látkami a barvenými kapalinami by měly být extrahovány pouze z dolní části tkáně (aby se minimalizovala potenciální kontaminace extrakčního roztoku isopropylalkoholu některou zkoušenou chemickou látkou, jež mohla zůstat v tkáni). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami, které nelze snadno vymýt, mohou být také extrahovány pouze z dolní části tkáně. Se souběžně testovanými negativními a pozitivními kontrolními látkami se zachází podobně jako se zkoušenou chemickou látkou. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 42) (11)(36).

36. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT mohou měření formazanu MTT ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti tkáně. Zkoušené chemické látky mohou interferovat s měřením formazanu MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan MTT, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan MTT (tj. cca 570 nm). Před testováním by měly být provedeny předběžné zkoušky, aby bylo možné identifikovat potenciální přímá redukční činidla MTT anebo barevně interferující chemické látky, a k detekci a korekci potenciální interference těchto zkoušených chemických látek by měly být provedeny dodatečné kontroly (viz odstavce 37–41). To je zvláště důležité v případě, že se určitá zkoušená chemická látka opláchnutím z tkáňové konstrukce RhCE zcela neodstraní nebo že pronikne do epitelu podobného rohovce, takže je přítomna v tkáňových konstrukcích, když se provádí analýza MTT. U zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici), které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT vzhledem k příliš velké interferenci, tj. silná absorbance při vlnové délce 570 ± 30 nm, může být na měření formazanu MTT použit HPLC/UPLC spektrofotometrický postup (viz odstavce 41 a 42) (11)(36). Podrobný popis, jak detekovat a korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, je k dispozici ve standardních prováděcích postupech validovaných referenčních metod (34)(35). V dodatku III, respektive IV jsou také uvedeny grafy ilustrující identifikaci a nakládání s přímými redukčními činidly MTT anebo barevně interferujícími chemickými látkami pro VRM1 a VRM2.

37. Aby bylo možné identifikovat potenciální interferenci zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a rozhodnout, zda jsou nutné další kontroly, zkoušená chemická látka se přidá do vody anebo isopropylalkoholu a inkubuje se po vhodnou dobu při pokojové teplotě (viz dodatek 2, (34)(35)). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje dostatečně světlo v pásmu 570 ± 20 nm u VRM1 (viz dodatek 3) nebo jestliže po smíchání zkoušené chemické látky s vodou vznikne zbarvený roztok u VRM2 (viz dodatek 4), považuje se zkoušená chemická látka za interferující se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT a je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 41 a 42 a dodatky III a IV) (34)(35). Při provádění standardního měření absorbance (OD) by měla být každá interferující zkoušená chemická látka aplikována na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení v živých tkáních (NSC_{living}) (34)(35). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět současně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT (% $Viability_{test}$) minus percentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno současně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%$Viability_{test}$]– [%NSC_{living}].

38. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Do roztoku MTT se přidá vhodné množství zkoušené chemické látky a směs se inkubuje přibližně po dobu přibližně 3 hodin při standardních kultivačních podmínkách (viz dodatky III a IV) (34)(35). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku (nebo suspenzi u nerozpustných zkoušených chemických látek) zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopných tkáňových konstrukcích RhCE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují a udržují v sobě zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Neživé tkáně u VRM1 se připravují expozicí nízké teplotě („usmrcené zmrazením“). Neživé tkáně u VRM2 se připravují dlouhodobou inkubací (např. minimálně 24 ± 1 hodina) ve vodě s následným uložením při nízké teplotě („usmrcené vodou“). Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo ke kontrole na nespecifickou redukci MTT (NSMTT (34)(35). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT (%$Viability_{test}$) minus percentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné současně s korigovanou zkouškou (% NSMTT), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%$Viability_{test}$] − [%NSMTT].

39. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že působí barevné interference (viz odstavec 37) i že přímo redukují MTT (viz odstavec 38), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek absorbujících světlo v rozsahu 570 ± 30 nm (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Je tedy nutné použít standardně kontroly NSMTT společně s kontrolami NSC_{living}. Zkoušené chemické látky, u nichž je provedena kontrola NSMTT i NSC_{living}, mohou být absorbovány a zachyceny v živých i neživých tkáních. Proto v tomto případě kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou

chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v neživých tkáních. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v živých tkáních. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}) (viz dodatky III a IV) (34)(35). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést současně s kontrolou NSMTT a se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ($\%Viability_{test}$) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus percentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole provedené současně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}), tj. skutečná životaschopnost tkáně = $[\%Viability_{test}]$ − [%NSMTT] − $[\%NSC_{living}]$ + $[\%NSC_{killed}]$.

40. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvyšovat OD (při provádění standardních měření absorbance) tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru a že nespecifická redukce MTT může také zvyšovat plochu píku formazanu MTT (při provádění HPLC/UPLC-spektrofotometrických měření) tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Proto je důležité, aby každá laboratoř stanovila OD / rozsah linearity plochy píku svého spektrofotometru s použitím např. formazanu MTT (CAS č. 57360-69-7), který je komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich (kat. č. M2003), než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely.

41. Standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru je vhodné pro posouzení zkoušených chemických látek, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když interference pozorované při měření formazanu MTT nejsou příliš silné (tzn. optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemické látky bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference je v lineárním rozsahu spektrofotometru). Avšak výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} ≥ 60 % (protokol VRM1 a VRM2 pro kapaliny) nebo ≥ 50 % (protokol VRM2 pro pevné látky) negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to stanovená hraniční hodnota používaná ve validovaných referenčních metodách na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 44). Standardní absorbanci (OD) však nelze měřit, když je interference s měřením formazanu MTT příliš silná (tj. vede k nesprávným hodnotám OD u zkoušených tkáňových extraktů spadajících mimo lineární rozsah spektrofotometru). Zabarvené zkoušené chemické látky nebo zkoušené chemické látky, které se zabarví při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem a které interferují příliš silně se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT, mohou být přesto hodnoceny pomocí HPLC/UPLC spektrofotometrie (viz dodatky III a IV). Je tomu tak proto, že systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT (podle postupu popsaného v odstavci 38). Kontroly NSMTT by se také měly použít u zkoušených chemických látek majících barvu (vlastní barvu nebo zbarvení ve vodě), která znesnadňuje posouzení jejich schopnosti přímé redukce MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie na měření formazanu MTT se percentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako percentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako: $\%Viability_{test}$ minus % NSMTT, jak je popsáno v poslední větě odstavce 38. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT nebo přímá redukční činidla MTT, jež jsou také barevně interferující, která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití UPLC/HPLC spektrofotometrie) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat zkušebními metodami RhCE, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrie může být použita u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (11)(36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC není možné, aby každý uživatel vytvořil přesně stejné systémové podmínky. Proto je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36)(38). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 5. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 5 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

43. U každého provedení zkoušky s použitím šarží tkáně RhCE, které splňují požadavky na kvalitu (viz odstavec 30), by tkáně ošetřené látkou pro negativní kontrolu měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle protokolu zkoušky, a neměly by být mimo doposud stanové meze popsané v tabulce 2 (viz odstavec 26). Podobně tkáně ošetřené látkou pro pozitivní kontrolu, tj. methylacetátem, by měly vykazovat střední životaschopnost tkáně < 50 % ve vztahu k negativní kontrole ve VRM1 u protokolu pro kapaliny i protokolu pro pevné látky a ≤ 30 % (protokol pro kapaliny) nebo ≤ 20 % (protokol pro pevné látky) ve vztahu k negativní kontrole ve VRM2, a odrážet tak schopnost tkání reagovat na dráždivou zkoušenou chemickou látku za podmínek zkušební metody (34)(35). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušených chemických látek anebo kontrolních látek by měla spadat do přijatelných limitů (tj. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 % a směrodatná odchylka (SD) mezi třemi tkáňovými replikáty by neměla přesahovat 18 %). Jestliže je negativní kontrola nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za „nezpůsobilé“ a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže je variabilita mezi tkáňovými replikáty zkoušené chemické látky mimo přijatelný rozsah, je třeba zkoušku považovat za „nezpůsobilou“ a zkoušenou chemickou látku je třeba testovat znovu.

Interpretace výsledků a predikční model

44. Hodnoty OD / plochy píku zjištěné u replikovaných tkáňových extraktů pro každou zkoušenou chemickou látku se použijí k výpočtu střední percentuální životaschopnosti tkání (průměru z tkáňových replikátů) normalizované podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Percentuální hraniční hodnoty životaschopnosti tkání pro určení zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), jsou uvedeny v tabulce 4. Výsledky by tedy měly být interpretovány takto:

— Zkoušená chemická látka je určena jako látka nevyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN a CLP (bez kategorie), jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziční inkubaci větší než (>) stanovená mezní hodnota percentuální životaschopnosti tkáně, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě není vyžadováno žádné další zkoušení jinými zkušebními metodami.

— Jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziční inkubaci menší než nebo rovna (≤) stanovené mezní hodnotě percentuální životaschopnosti tkáně, nelze provést žádnou predikci, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě bude nutné další zkoušení jinými zkušebními metodami, protože zkušební metody RhCE vykazují určitý počet falešně pozitivních výsledků (viz odstavce 14–15) a nedokážou rozlišit mezi kategoriemi 1 a 2 podle GHS OSN a CLP (viz odstavec 17).

Tabulka 4

Predikční modely podle klasifikace GHS OSN a CLP

Validovaná referenční metoda	Bez kategorie	Nelze předpovědět
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (pro oba protokoly)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokoly pro kapaliny)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokol pro pevné látky)	střední životaschopnost tkáně > 50 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 50 %

45. U zkoušené chemické látky s jednoznačným výsledkem by měla stačit jedna zkouška za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 60 ± 5 % (VRM1 a VRM2 pro protokol pro kapaliny) nebo 50 ± 5 % (VRM2 pro protokol pro pevné látky), by se měla zvážit druhá zkouška, jakož i třetí zkouška v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma zkouškami.

46. Pokud je to vhodné a zdůvodněné, lze pro konkrétní druhy směsí uvažovat různé mezní hodnoty percentuální životaschopnosti tkání rozlišující klasifikované zkoušené chemické látky od neklasifikovaných, aby se zvýšila celková účinnost zkušební metody pro tyto druhy směsí (viz odstavec 14). Srovnávací chemické látky mohou být užitečné pro hodnocení potenciálu vážného poškození očí / podráždění očí neznámými zkoušenými chemickými látkami nebo třídami produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativní toxicity klasifikované chemické látky pro oči ve specifickém rozmezí pozitivních odpovědí.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

47. Údaje získané ve zkoušce za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD / plochy píku formazanu MTT a vypočítané údaje percentuální životaschopnosti tkání za zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky a konečná predikce zkušební metody RhCE) by se měly vykazovat ve formě tabulky za každou zkoušenou chemickou látku, popřípadě včetně údajů z opakovaných zkoušek. Kromě toho by se za každou jednotlivou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku měla uvést střední percentuální životaschopnost tkáně a rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty (jestliže n = 2 replikované tkáně) nebo SD (jestliže n ≥ 3 replikované tkáně). Za každou zkoušenou chemickou látku je třeba uvést všechny pozorované interference zkoušené chemické látky s měřením formazanu MTT ve formě přímé redukce MTT anebo barevné interference.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— Charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— skupenství a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Látky pozitivní a negativní kontroly

— Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— skupenství, těkavost, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění použití jiné negativní kontroly než ultračisté H_2O, případně DPBS bez Ca_2^+/Mg_2^+,

— zdůvodnění případného použití jiné pozitivní kontroly než čistého methyl-acetátu,

— odkaz na dosavadní výsledky pozitivních a negativních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

— Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie.

— *Použitý model tkáňové konstrukce RhCE a protokol (případně s uvedením zdůvodnění jejich volby)*

Podmínky zkušební metody

— Použitá tkáňová konstrukce RhCE, včetně čísla šarže,

— (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení (např. spektrofotometru),

— popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis použitého HPLC/UPLC spektrofotometrického systému,

— úplné podklady ke konkrétní použité tkáňové konstrukci RhCE včetně jejího chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:

  i) řízení kvality životaschopnosti (dodavatel);

  ii) životnost za podmínek zkušební metody (dodavatel);

  iii) řízení kvality bariérové funkce;

  iv) morfologii, je-li k dispozici;

  v) reprodukovatelnost a prediktivní schopnost;

  vi) jiné údaje o řízení kvality tkáňové konstrukce RhCE, jsou-li k dispozici,

— odkaz na dosavadní údaje tkáňové konstrukce RhCE. Měl by zejména zahrnovat: přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na dosavadní údaje o šaržích,

— prohlášení, že zkoušející zařízení prokázalo způsobilost při používání zkušební metody před rutinním použitím otestováním vhodných chemických látek.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

— Střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Postup zkoušky

— Podrobnosti použitého zkušebního postupu,

— dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních látek,

— doba a teplota expozice, doba poexpozičního ponoření a (případně) doba poexpoziční inkubace,

— popis všech úprav zkušebního postupu,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}).

Výsledky

— Tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každé provedení zkoušky (případně včetně opakovaných experimentů) a každé měření replikátů včetně hodnoty OD nebo plochy píku formazanu MTT, percentuální životaschopnosti tkáně, střední percentuální životaschopnosti tkáně, rozdílu mezi replikáty nebo směrodatnými odchylkami a konečné predikce,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvené zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdílu mezi tkáňovými replikáty nebo směrodatnými odchylkami, konečné korigované percentuální životaschopnosti tkáně a konečné predikce,

— výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků, např. zbarvení tkání zbarvenou zkoušenou chemickou látkou.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Dostupné na webových stránkách: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitola B.5 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

(3) Kapitola B.47 této přílohy, Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

(4) Kapitola B.48 této přílohy, Zkušební metoda odděleného kuřecího oka pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat.

(5) Kapitola B.61 této přílohy, Zkušební metoda průniku fluoresceinu ke zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči.

(6) Kapitola B.68 této přílohy, Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici *in vitro* pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL-ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: LX 4610,2787/043697. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. Chem. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: LX 4610,2787/390390. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL-ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Návrh).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. Chem. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na webových stránkách: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na webových stránkách: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thor135nton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na webových stránkách: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No. 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její „relevantnosti“. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (18).

Srovnávací chemická látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) neměnný a spolehlivý zdroj (zdroje) pro její určení a charakterizaci; ii) podobnost se strukturou, funkcí anebo chemickou či produktovou třídou se zkoušenou chemickou látkou (látkami); iii) známé fyzikálněchemické vlastnosti; iv) podklady ke známým účinkům; a v) známé účinky v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Postupný přístup používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že je není nutné klasifikovat a označovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace a označení (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: Viz „přesnost“.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a zornici a propouští světlo dovnitř oka.

CV: Variační koeficient.

Dev: Odchylka.

EIT: Zkouška dráždivosti pro oči.

EURL-ECVAM: Referenční laboratoř EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech.

Podráždění očí: Vyvolání změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a „kategorie 2 GHS OSN/CLP“.

ET_{50}: Doba expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost tkáně snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (lidský rohovkový epitel).

HPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC_{50}: Koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice SDS).

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanesené na tkáňovou konstrukci RhCE, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí epitelového povrchu.

Nevratné účinky na oči: Viz „vážné poškození očí".

LLOQ: Dolní mez kvantifikace.

logP: Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Negativní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že nezpůsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky a používá se na stanovení 100 % životaschopnosti.

Neklasifikované: Chemické látky, které nejsou klasifikované jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 GHS OSN/CLP, kategorie 2A nebo 2B GHS OSN) nebo jako látky vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP). Tento pojem je zaměnitelný s pojmem „bez kategorie GHS OSN/CLP".

NSC_{killed}: Nespecifická barva u neživých tkání.

NSC_{living}: Nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: Nespecifická redukce MTT.

OD: Optická hustota.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, která je považována za vědecky platnou, jež slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují se: 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 (18).

Pozitivní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

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 (18).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (18).

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k 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 chemické látky (18).

Reprodukovatelnost: Shoda mezi výsledky získanými při opakovaném zkoušení téže zkoušené chemické látky za použití stejného zkušebního protokolu (viz „spolehlivost“) (18).

Vratné účinky na oči: Viz „dráždivé účinky na oči“.

RhCE: Rekonstruovaný epitel podobný lidské rohovce.

Provedení zkoušky: Jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a „kategorie 1 GHS OSN a CLP“.

Standardní pracovní postupy (SOP): Formální písemné postupy, které podrobně popisují, jak se mají vykonávat konkrétní rutinní laboratorní operace a operace při konkrétních zkouškách. Jsou vyžadovány podle správné laboratorní praxe.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkouška: Jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně dvou tkáňových replikátech příslušným standardním pracovním postupem.

Životaschopnost tkáně: Parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace v rekonstruované tkáni jako její schopnost redukovat vitální barvivo MMT a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Přístup „shora dolů“: Postupný přístup používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Strategie postupného zkoušení: Strategie zkoušení po krocích, při které se zkušební metody využívají postupně. Všechny existující informace o zkoušené chemické látce se přezkoumávají na každém stupni s použitím hodnocení závažnosti důkazů, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně strategie. Pokud potenciál/intenzitu nebezpečnosti zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací na daném stupni, další zkoušení není nutné (18).

ULOQ: Horní mez kvantifikace.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 podle GHS OSN/CLP: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 podle GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (2A nebo 2B GHS OSN). Tento pojem je zaměnitelný s výrazem „neklasifikované“.

UPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkušební metoda není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (18).

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 (18).

VRM: Validovaná referenční metoda.

VRM1: EpiOcular™ EIT se nazývá validovaná referenční metoda 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT se nazývá validovaná referenční metoda 2.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti zkoušené látky.

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKOUŠEK RHCE VALIDOVANÝCH PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoly	Kapaliny (pipetovatelné při 37 ± 1°C nebo nižších teplotách po dobu 15 min)	Pevné látky (nepipetovatelné)	Kapaliny a viskózní látky (pipetovatelné)	Pevné látky (nepipetovatelné)
Povrch modelu	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Počet tkáňových replikátů	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	50 µl + 1 ml H_2O po dobu 60 min. při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) nebo 50 µl + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody > 0,08 (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	50 mg + 1 ml H_2O po dobu 60 min. při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) a/nebo 50 mg + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené i nezbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody > 0,08 (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	10 µl + 90 µl H2O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě (RT, 18–28 °C) → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni	10 mg + 90 µl H2O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)
Předběžné ošetření	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}bez DPBS po dobu 30 ± 2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, chráněno před světlem.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} – bez DPBS po dobu 30±2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, chráněno před světlem.	-	-
Experimentální dávky a aplikace	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) pomocí kalibrovaného nástroje (např. zarovnaná kalibrovaná odměrka s obsahem 50 mg chloridu sodného).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} bez DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) U viskózních látek použijte nylonovou síťku	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}bez DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Doba a teplota expozice	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 hodin (± 0,25 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 hodiny (± 0,1 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH

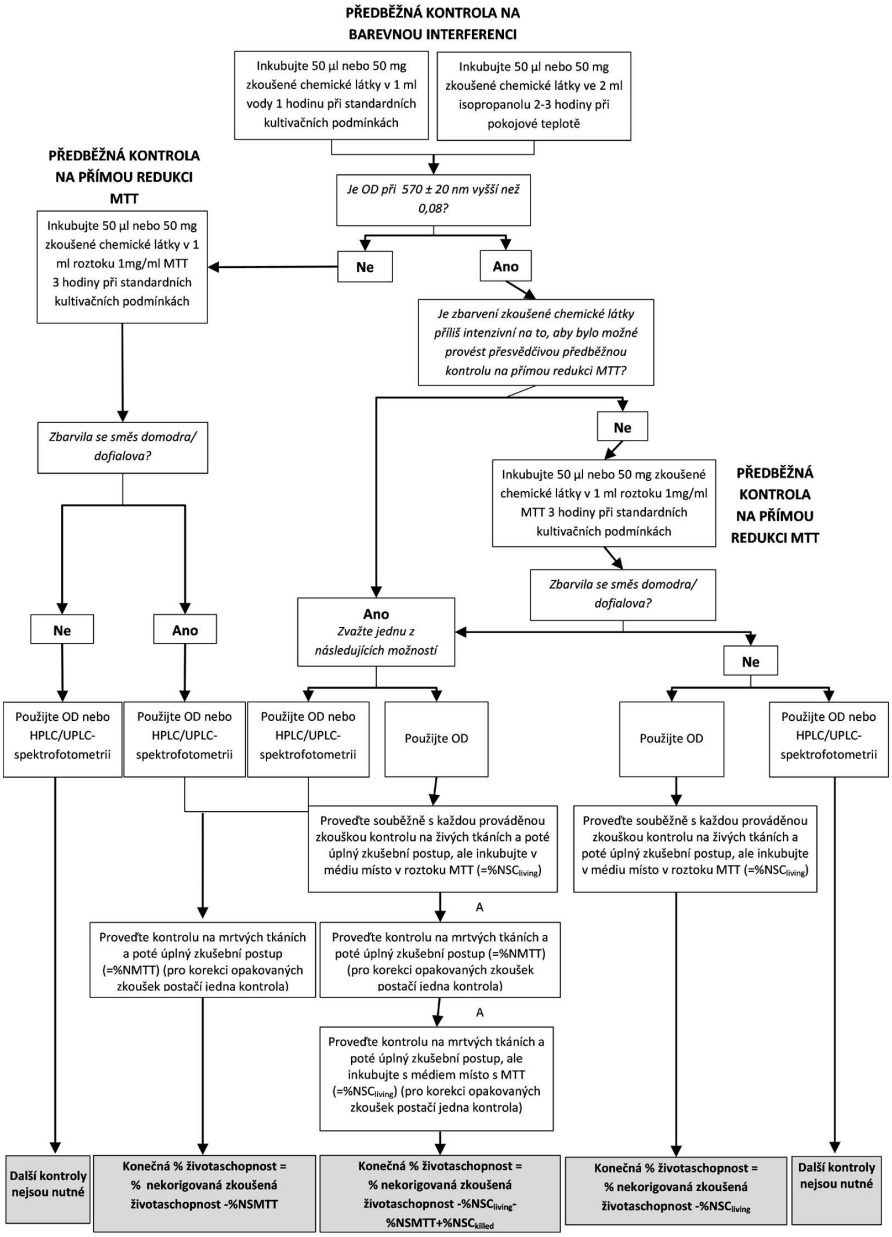
Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Propláchnutí při pokojové teplotě	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Ponoření po expozici	12 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	25 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu
Inkubace po expozici	120 min (± 15 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 hod. (± 0,25 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	žádná	18 hod. (± 0,5 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Negativní kontrola	50 µl H_2O Zkoušeno současně	50 µl H_2O Zkoušeno současně	DPBS bez 30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2} Zkoušeno současně	DPBS bez 30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2} Zkoušeno současně
Pozitivní kontrola	50 µl methylacetátu Zkoušeno současně	50 µl methylacetátu Zkoušeno současně	30 ± 2µl methylacetátu Zkoušeno současně	30 ± 2µl methylacetátu Zkoušeno současně

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Roztok MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Extrakční rozpouštědlo	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	2–3 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při 4–10°C	2–3 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při 4–10°C	4 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo alespoň přes noc bez protřepávání při 4–10°C	Alespoň 2 hod. s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě
Odečet OD	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru
Kontrola kvality tkání	Expozice za použití 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Expozice za použití 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min. expozice za použití SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min. expozice za použití SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kritéria přijatelnosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 0,8 a < 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 0,8 a < 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 6 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 30 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.

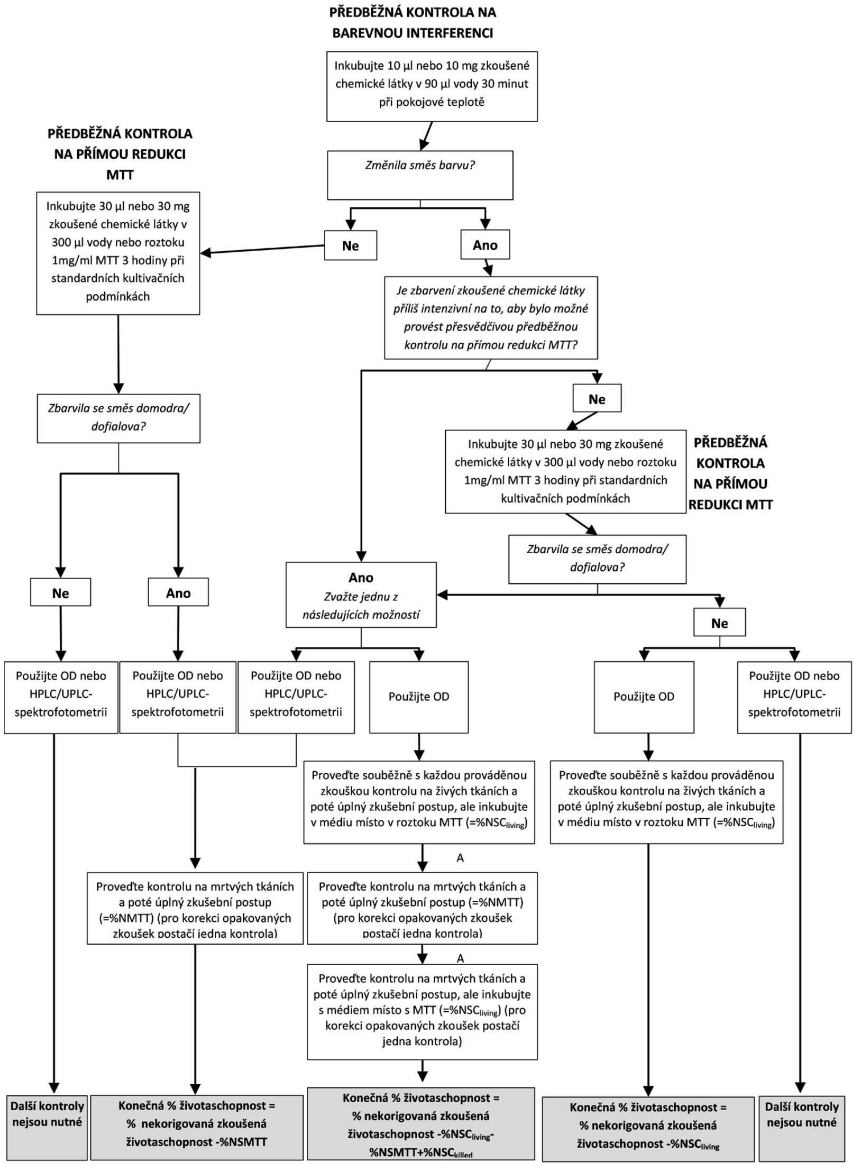
Dodatek 3

GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI ČINIDLY MTT ANEBO BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM1



Dodatek 4

GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI ČINIDLY MTT ANEBO BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM2



Dodatek 5

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z TKÁŇOVÝCH KONSTRUKCÍ RHCE

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), a analýza barviva (např. methylenová modř)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$ ([1])
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤ % matricového jevu ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu ULOQ ([2])	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	Den 1: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 2: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 3: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po Několika dnech uložení při −20°C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Dolní mez kvantifikace, definovaná, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Horní mez kvantifikace, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol (~70 µg/ml ve VRM), tj. 200 µg/ml.

B.70 **ZKOUŠKA *IN VITRO* S VYUŽITÍM REKOMBINANTNÍCH ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ NA DETEKCI CHEMICKÝCH LÁTEK S VAZEBNOU AFINITOU NA ER**

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 493 (2015). Pokyn č. 493 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku lidských rekombinantních analýz *in vitro* na detekci látek s vazebnou afinitou na estrogenové receptory (analýzy vazby hrER). Skládá se ze dvou mechanisticky a funkčně podobných analýz pro zjištění látek, které se vážou na estrogenový receptor (tj. ERα), a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných analýz podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tuto metodiku vycházející z funkční způsobilosti, jsou:

— Freyberger-Wilsonova (FW) *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory (ER) s využitím celého lidského rekombinantního ERα (2) a

— *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory s využitím lidského rekombinantního proteinu s ligand vázající doménou Ústavu pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) (2).

K dispozici jsou standardy funkčnosti (PS) (3), které usnadňují vývoj a validaci podobných zkušebních metod pro stejné riziko a umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 493, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy. Podobné analýzy však budou přidány až po kontrole a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 493 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na vazbu na estrogenové receptory při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách standardizovaných pokynů pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (4). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti. Analýzy vazby na ER popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „*analýzy in vivo poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách*“. Tato zkušební metoda je v testech vazby ligandu na receptor *in vitro* určena na zjištění ligandů na lidský estrogenový receptor alfa (ERα).

3. Relevance testu vazby ER *in vitro* pro biologické funkce byla jasně prokázána. Testy vazby ER jsou určeny k identifikaci chemických látek, které mají potenciál narušit dráhu estrogenových hormonů a v posledních dvou desetiletích se široce používají pro charakterizaci distribuce ER v tkáních, jakož i pro identifikaci agonistů/antagonistů ER. Tyto testy odrážejí interakci mezi ligandem a receptorem, což je první krok estrogenové signální dráhy, který je zásadně důležitý pro reprodukční funkci všech obratlovců.

4. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů a indukovat negenomové účinky, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (5)(6)(7). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému. Nesprávná signalizace ER může vést k takovým účinkům, jako je zvýšené riziko hormonálně dependentního karcinomu, narušení plodnosti a změny růstu a vývoje plodu (8).

5. Analýzy vazby *in vitro* vycházejí z přímé interakce látky s vazebným místem ligandu na specifický receptor, který reguluje transkripci genu. Hlavní složka testu vazby lidského rekombinantního estrogenového receptoru alfa (hrERα) měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([^{3}H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifičnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

6. Validační studie vazebných analýz CERI a FW prokázaly jejich relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (2).

7. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

Platnost a omezení testů vazby ligandu na receptor

8. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat informace o molekulární iniciační události (MIE), které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se chemické vazby na doménu ERα vázající ligand v systému *in vitro*. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.

9. Vazba přirozeného ligandu, 17β-estradiolu, je prvním krokem v sérii molekulárních událostí, který aktivuje transkripci cílových genů a nakonec vrcholí fyziologickou změnou (9). Vazba na doménu ERα vázající ligand se tedy považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED) mediovaného ER, i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s místy ERα jinými, než je kapsa vázající ligand, ii) interakcí s jinými receptory relevantními pro estrogenovou signalizaci, ERβ a estrogenovým receptorem spřaženým s G-proteinem, jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, iii) syntézy hormonů, iv) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, v) distribuce hormonů do cílových tkání a vi) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.

10. Tato zkušební metoda se zabývá schopností látek vázat se na lidský ERα, ale nerozlišuje mezi agonisty a antagonisty ERα. Tyto analýzy neřeší další události v řetězci, jako je genová transkripce nebo fyziologické změny. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé jednosložkové látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Analýzy jsou však teoreticky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

11. Receptorové systémy bez buněk nemají žádnou vnitřní metabolickou kapacitu a nebyly validovány v kombinaci s metabolickými enzymatickými systémy. Mohlo by však být možné začlenit metabolickou aktivitu do plánu studie, ale vyžadovalo by to další práci v oblasti validace.

12. Chemické látky, které by mohly protein (tj. receptorový protein) denaturovat, jako jsou povrchově aktivní látky nebo chemické látky, které mohou změnit pH zkušebního pufru, nesmí být testovány nebo mohou být testovány pouze při koncentracích, které tyto interakce vylučují. Jinak je rozsah koncentrací, které mohou být zkoušeny v testech zkoušené chemické látky, omezen na její rozpustnost ve zkušebním pufru.

13. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu 24 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými analýzami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz *in vitro* na transkripční aktivaci ER anebo uterotrofní analýzy, 17 klasifikováno jako ER vázající látky a 6 jako ER nevázající látky (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1, byla mezi oběma analýzami u klasifikace všech látek do 10^{-4} M téměř 100 % shoda, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako ER vázající nebo nevázající. Doplňkové informace o této skupině látek i o dalších látkách zkoušených v analýzách vazby ER v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro analýzu vazby hrER (3), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

Tabulka 1

Klasifikace látek vázajících a nevázajících se na ER při zkoušení pomocí analýz vazby na hrER FW a CERI v porovnání s očekávanou odpovědí

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
1	17β-estradiol	50-28-2	*váže se*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	váže se	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel	68-23-5 Org.	*váže se*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Norethindron	68-22-4	*váže se*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
4	Di-n-butylftalát	84-74-2	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se (**) (+)	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
5	DES	56-53-1	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	17α-ethynylestradiol	57-63-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Meso-Hexestrol	84-16-2	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (heterocyklický), flavonoid	Přírodní produkt
9	Equol	531-95-3	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fytoestrogenový metabolit	Přírodní produkt
10	Butylparaben (*n* butyl-4-hydroxybenzoan)	94-26-8	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Paraben	Konzervant

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
11	Nonylfenol (směs)	84852-15-3	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Organochlor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Steroid	Přírodní produkt
14	Zearalenon	17924-92-4 Org.	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (heterocyklický), lakton	Přírodní produkt
15	Tamoxifen	10540-29-1	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Steroid, nefenolový	Přírodní produkt
17	Bisfenol A	80-05-7	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fenol	Chemický meziprodukt
18	4-*n*-heptylphenol	1987-50-4	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neurčité [a]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt
19	Kepon (Chlordecon)	143-50-0	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (halogenovaný)	Pesticid
20	Benzo(a)anthracen	56-55-3	*neváže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se [b]	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se [b]	Aromatický uhlovodík	Meziprodukt
21	Enterolakton	78473-71-9	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fytoestrogen	Přírodní produkt
22	Progesteron	57-83-0	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Steroid	Přírodní produkt

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
23	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	*neváže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se	Silan	Povrchový modifikátor
24	Atrazin	1912-24-9	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Heterocyklická sloučenina	Herbicid

(*) Mez rozpustnosti < 1×10^{-4}M.

(**) Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3}M (např. zákal).

(+) V průběhu validační studie byl di-*n*-butylftalát (DBP) testován jako zakódovaná zkoušená látka při koncentracích do 10^{-3}M. Za těchto podmínek bylo v některých laboratořích pozorováno snížení vazby radioligandu při nejvyšší koncentraci (10^{-3}M) anebo nejednoznačné vynesení křivky. V těchto provedeních zkoušky byl DBP klasifikován v 3/5 laboratoří, které použily analýzu CERI, a v 5/6 laboratoří, které použily analýzu FW, jako „neurčitý“ nebo „váže se“ (viz odkaz (2), části IV.B.3a,b a VI.A).

(a) Klasifikace neodpovídala očekávané klasifikaci. Vzhledem ke klasifikaci 4-*n*-heptylfenolu jako „neurčitý“ nebo „váže se“ v 3/5 laboratoří byla průměrná klasifikace neurčitá. Bližší kontrola odhalila, že to bylo způsobeno omezením chemické rozpustnosti, což zabránilo vzniku celé vazebné křivky.

(b) Při předvalidační studii byl benz(a)antracen přeřazen mezi látky, které se nevážou (tj. negativní), a to na základě zveřejněné literatury prokazující, že estrogenní aktivita *in vitro* uváděná u této látky (16) závisí primárně na její metabolické aktivaci (17)(18). Enzymatická metabolická aktivace látky by se v nebuněčných analýzách vazby na hrER použitých v této mezilaboratorní validační studii nepředpokládala. Správná klasifikace této látky tedy je „neváže se“ při použití za experimentálních podmínek pro analýzy FW a CERI.

SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER

Zásadní složky zkoušky

14. Tato zkušební metoda platí pro analýzy používající receptor ER a vhodný silný ligand na receptor, který může být použit jako marker/stopovací látka pro analýzu a se zvyšujícími se koncentracemi zkoušené chemické látky může být vytěsněn. Vazebné analýzy sestávají z těchto dvou hlavních složek: 1) saturační vazby a 2) kompetitivní vazby. Saturační vazebná analýza se používá na potvrzení specifičnosti a aktivity receptorových přípravků, zatímco kompetitivní vazebný experiment se používá na vyhodnocení schopnosti zkoušené chemické látky vázat se na hrER.

Kontroly

15. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční zkoušky s estrogenem a kontroly. Souběžné kontroly (rozpouštědlo (vehikulum), pozitivní (vazba na ER; silná a slabá afinita), negativní (neváže se)) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat: 1) vysokou (přibližně úplné vytěsnění radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát.

Standardní postupy kontroly kvality

16. Standardní postupy řízení kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby byly zajištěny aktivní receptory a správné koncentrace chemické látky a aby bylo zajištěno, že toleranční meze zůstanou u vícečetných replikátů stabilní a bude zachována schopnost podávat očekávané odpovědi vazby na ER v průběhu času.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

17. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy provedením saturačních zkoušek na potvrzení specifičnosti a aktivity přípravku ER a kompetitivních vazebných zkoušek s referenčním estrogenem a kontrolami (s látkou se slabou vazbou a látkou, která se neváže). Laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi s výsledky za referenční estrogen a kontroly získanými z 3–5 nezávislých experimentů provedených v různé dny. Tyto experimenty budou základem pro referenční estrogen a historické kontroly pro tuto laboratoř a budou použity jako částečné hodnocení přijatelnosti analýzy pro budoucí zkoušky.

18. Odpovědi zkušebního systému budou potvrzeny také zkoušením vhodných látek uvedených v tabulce 2. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy vazby na ER (3). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s vazebnou aktivitou na ER a vykazují vhodný rozsah síly očekávané od látek, které se vážou na ER (tj. silné až slabé), a látek, které se na ER nevážou (tj. negativní). U každé látky pro prokázání způsobilosti by měly zkoušené koncentrace zahrnovat rozmezí uvedené v tabulce 2. Pro každou látku by se měly provést alespoň tři experimenty a výsledky by měly být v souladu s očekávanou chemickou aktivitou. Každý experiment by se měl provádět nezávisle (tj. s čerstvými roztoky zředěného receptoru, chemickými látkami a reagenciemi), a to se třemi opakováními u každé koncentrace. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl provést každý technik, který se analýzy učí.

Tabulka 2

Seznam kontrolních látek a látek pro prokázání způsobilosti pro kompetitivní vazebné analýzy hrER [1]

Č.	Název látky	CASRN [2]	Předpokládaná odpověď [3] [4]	Rozpětí zkušebních koncentrací (M)	Třída chemických látek MeSH [5]	Třída produktu [6]
	Kontroly (referenční estrogen, slabá vazba, neváže se)					
1	17−εστραδιολ	50-28-2	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel (nebo) Norethindron	68-23-5 (or) 68-22-4	váže se	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	neváže se	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silan	Povrchový modifikátor
	Vhodné látky [6]					
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	17α-ethynylestradiol	57-63-6	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	meso-Hexestrol	84-16-2	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Tamoxifen	10540-29-1	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	váže se	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, flavonoid	Přírodní produkt

Č.	Název látky	CASRN (2)	Předpokládaná odpověď (3) (4)	Rozpětí zkušebních koncentrací (M)	Třída chemických látek MeSH (5)	Třída produktu (6)
9	Bisfenol A	80-05-7	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Zearalonone	17924-92-4	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, lakton	Přírodní produkt
11	Butylparaben	94-26-8	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Konzervant
12	Atrazin	1912-24-9	neváže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
13	Di-n-butylftalát (DBP) (7)	84-74-2	neváže se (8)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
14	Kortikosteron	50-22-6	neváže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Přírodní produkt

(1) Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací vazby na ER, srovnatelnou sílou a ze stejné chemické třídy.
(2) Zkratky: CASRN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service Registry Number)
(3) Klasifikace jako látka, která se váže na ERα, nebo látka, která se neváže, v průběhu validační studie pro analýzy vazby na hrER CERI a FW (2).
(4) Vazebná aktivita na ER vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (9) a z empirických údajů a dalších informací získaných ze zveřejněných a kontrolovaných citovaných studií (10)(11)(12)(13)(14)(15).
(5) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) DBP může být použit jako alternativní kontrola, která se neváže, zkoušená při maximální koncentraci 10^{-4} M.
(8) Mez rozpustnosti pro tuto látku je 10^{-4} M. Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3}M (např. zákal).

Zkoušení rozpustnosti a stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušené chemické látky

19. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkoušky. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 nm. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s osmi log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

20. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční estrogen a kontrolu použitou pro každý experiment. Za prvé, na destičce 1 by měly celé křivky koncentrace pro referenční kontroly z každého experimentu odpovídat mírám funkčnosti u parametrů vynesené křivky (např. IC_{50} a Hillův koeficient) podle výsledků uvedených pro příslušné protokoly pro analýzy CERI a FW (dodatek 2 a 3) a dosavadních kontrolních dat z laboratoře provádějící zkoušku. Všechny kontroly (referenční estrogen, slabá vazba a neváže se) by měly být u každého experimentu správně klasifikovány. Za druhé, u kontrol na všech dalších destičkách je třeba posuzovat, zda odpovídají destičce 1. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol kompetitivní vazebné křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi třemi nezávislými provedeními zkoušky by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčního estrogenu a kontrol. Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčního estrogenu a slabé vazby z vícečetných experimentů. Při posuzování výsledků kontrol z každého provedení zkoušky i výsledků za každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem.

Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

— Údaje by měly postačovat na kvantitativní posouzení vazby na ER.

— Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušené chemické látky.

Analýza údajů

21. Stanovený postup analýzy údajů o nasycené a kompetitivní vazbě by měl odpovídat hlavním zásadám pro charakterizaci interakcí mezi receptorem a ligandem. Údaje o nasycené vazbě se obvykle analyzují promocí nelineárního regresního modelu, který zohledňuje celkovou a nespecifickou vazbu. Při určování B_{max} a K_d může být nutná korekce úbytku ligandu (např. Swillens, 1995 (19)). Data z kompetitivních vazebných analýz se obvykle transformují (např. percentuální specifická vazba a koncentrace zkoušené chemické látky (log M)). Odhady log (IC_{50}) za každou zkoušenou chemickou látku se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici. Po první analýze je třeba stanovit parametry vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře vazebná data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce. V některých případech může být nutná další analýza, aby byl dosažen nejlepší tvar křivky (např. omezení horní anebo dolní části křivky, použití pravidla 10 %, viz dodatek 4 a odkaz 2 (oddíl III.A.2).

22. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 20) ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování správných výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.

Obecná kritéria interpretace údajů

23. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů o vazbě na ER. Kvalitativní (např. váže se / neváže se) anebo kvantitativní (např. log iC_{50}, relativní vazebná afinita (RBA) atd.) posouzení aktivity zprostředkované hrER by však mělo vycházet z empirických údajů a řádného vědeckého úsudku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

24. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

— použitá analýza

Kontrola / referenční látka / zkoušená chemická látka

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla podle potřeby přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, SMILES nebo kód InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,

Receptory:

— zdroj receptoru (dodavatel, katalogové číslo, šarže, druh receptoru, koncentrace aktivního receptoru uvedená dodavatelem, certifikace dodavatele),

— charakterizace receptorů (včetně výsledků nasycené vazby): K_d, B_{max},

— uchovávání receptorů,

— radioizotopově značený ligand:

— dodavatel, katalogové číslo, šarže, měrná aktivita.

Zkušební podmínky:

— meze rozpustnosti za podmínek zkoušky,

— složení vazebného pufru,

— koncentrace receptoru,

— koncentrace stopovací látky (tj. radioizotopově značený ligand),

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— procento vehikula v konečné analýze,

— teplota a doba inkubace,

— způsob separace vázané/volné látky,

— pozitivní a negativní kontroly / referenční látky,

— kritéria klasifikace zkoušky na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Kontrola přijatelnosti:

— skutečné hodnoty IC_{50} a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční látky.

Výsledky:

— naměřená data a data o vázaných/volných látkách,

— případně kontrola potvrzení denaturace,

— pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),

— hodnoty RBA a IC_{50} podle potřeby,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95 % CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

Diskuse o výsledcích:

— uplatnění pravidla 10 %.

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Pravidlo 10 %: Možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu o 10 % nebo více nad hodnotu pozorovanou u střední hodnoty při nižší koncentraci (viz dodatek 4).

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad" a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

CF: Koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních distruptorů.

Chemická látka: Látka nebo směs.

CV: Variační koeficient.

E2: 17β-estradiol.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hERα: Lidský estrogenový receptor alfa.

ER: Estrogenový receptor.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17β-estradiolu vázat se na estrogenové receptory. Touto zkušební metodou lze detekovat vazbu na hERα.

IC50: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře" (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která dává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované analýzy. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 493.

RBA: Relativní vazebná afinita. RBA látky se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Vyhodnocuje se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

SD: Směrodatná odchylka.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Validovaná zkušební metoda: Analýza, 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 (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

Dodatek 2

FREYBERGER-WILSONOVA (FW) IN VITRO SATURAČNÍ ANALÝZA A ANALÝZA KOMPETITIVNÍ VAZBY NA ESTROGENOVÝ RECEPTOR (ERA) S VYUŽITÍM CELÉ DÉLKY LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO ERA

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturace a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ERα) používají celou délku lidského receptoru ERαα(hrERα), který je vytvořen a izolován z buněk hmyzu infikovaných bakulovirem. Protokol, který vypracovali Freyberger a Wilson, prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.

2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrERα v celé délce. Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17β-estradiolu ve vazbě na hrERα. Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC_{50} (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrERα v porovnání s 17β-estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrERα, látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsaných u vazebných křivek.

3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrERα měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([3H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.

6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifičnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).

8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat [3H]17β-estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby [3H]17β-estradiolu (nazývá se „50 % inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu [3H]17β-estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vynesou pokud možno do určité formy Hillovy rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrERα

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrERα prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:

— Proveďte saturační vazebnou analýzu [^{3}H]-17β-estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrERα. V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrERα vůči [^{3}H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro každou šarži hrERα.

— Proveďte kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17β-estradiol)), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC_{50} a dalších relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrERα. Parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky by měly být v rozmezí 95 % konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1

Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza FW hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dolní (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillův koeficient	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$logIC_{50}$ (M)	–8,92 [c]	0,18 (67)	–8,97	–8,88
Norethynodrel	Horní (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dolní (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillův koeficient	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Norethindrone [c]	Horní (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dolní (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillův koeficient	–1,41	0,32 (27)	–1,53	-1,28
	$logIC_{50}$(M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

[a] Střední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byly vypočítány pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).
[b] 95 % konfidenční intervaly jsou uvedeny jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.
[c] Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.
Rozsah IC_{50}bude záviset na Kd receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu IC_{50}podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

10. Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagenciemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

11. Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.

12. Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,25, 0,5, 0,75 a 1 nM inkubovat v nepřítomnosti (celková vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba vypočítaná jako rozdíl celkové a nespecifické vazby se nanese proti nominální koncentraci receptoru. Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 20 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající nominální koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,5 nM.

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 20 % kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 20 % kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^{3}H]17β-estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

— Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení celkové vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [3H]17β-estradiol.

— V přítomnosti tisícinásobně zvýšené koncentrace neznačeného 17β-estradiolu nad značený 17β-estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17β-estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.

— Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^{3}H]-17β-estradiolu a neznačeného 17β-estradiolu

15. Zředěné roztoky [^{3}H]-17β-estradiolu se připravují přidáním zkušebního pufru do 12 nM zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu, aby se získaly koncentrace v počátečním rozsahu od 0,12 nM do 12 nM. Přidáním 40 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 μl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 do 3,0 nM. Příprava zkušebního pufru, zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu a zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu FW (2).

16. Zředěné etanolové roztoky 17β-estradiolu se připravují přidáním zkušebního pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v počátečním rozsahu od 0,06 μM do 6 μM. Přidáním 80 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 μl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 μM do 3,0 μM. Konečná koncentrace neznačeného 17β-estradiolu v jednotlivých jamkách nespecifické vazebné analýzy by měla být tisícinásobkem koncentrace značeného [^{3}H]-17β- estradiolu. Příprava roztoků neznačeného 17β-estradiolu je podrobně popsána v protokolu FW (2).

17. Měla by se použít taková nominální koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu 20 ± 5 % (viz odstavce 12–13). Roztok hrERα je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci. Příklad uspořádání koncentrací a objemů [^{3}H]-17β-estradiolu, neznačeného 17β-estradiolu, pufru a receptoru je uveden v dodatku 2.2.

Tabulka 2

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Celková vazba (rozpouštědlo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: estrogenový receptor
E2:: neznačený 17β-estradiol

19. Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2–8 °C po dobou 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Měření [3H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα se separuje z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 80 μl studené suspenze DCC do každé jamky, mikrotitrační destičky se protřepávají po dobu 10 minut a odstřeďují po dobu 10 minut při 2 500 ot./min. Aby se v průběhu tohoto procesu minimalizovala disociace vázaného [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα, je velmi důležité, aby byly pufry i experimentální jamky udržovány při teplotě mezi 2 a 8 °C a aby byl každý krok proveden rychle. Pro efektivní a rychlé zpracování destiček je nezbytná třepačka na mikrotitrační destičky.

21. Poté se velmi opatrně odebere 50 μl supernatantu obsahujícího [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα, aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a umístí se na druhou mikrotitrační destičku.

22. Pak se do každé jamky přidá 200 μl scintilační kapaliny, schopné přeměnit kinetickou energii jaderných emisí na světelnou energii (A1–B12 a D1 až E12). Jamky G1–H12 (označené jako celkové dpm) představují sériové naředěné roztoky [^{3}H]-17β-estradiolu (40 μl), které je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny v jamkách měřicí destičky, jak je vyznačeno v tabulce 3, tj. tyto jamky obsahují pouze 200 μl scintilační kapaliny a příslušně naředěný roztok [3H]-17β-estradiolu. Tato měření ukazují, kolik [^{3}H]-17β-estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

Tabulka 3

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze, měření radioaktivity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Celková vazba (rozpouštědlo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (dpm celkem)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Celkem dpm (-*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: estrogenový receptor
E2:: neznačený 17β-estradiol
dpm:: rozpady za minutu
(*) Radioaktivní sériová ředění [^{3}H]-značeného estradiolu se zde přidávají přímo do 200 μl scintilační kapaliny v jamkách G1–H12.

23. Měření by mělo být zahájeno se zpožděním alespoň 2 hodiny a doba počítání by měla být 40 minut na jamku. Ke stanovení dpm/jamku s korekcí na zhášení se používá scintilační spektrometr mikrotitračních destiček. Není-li k dispozici scintilační spektrometr pro mikrotitrační destičky, mohou se vzorky alternativně měřit klasickým spektrometrem. Za těchto podmínek může být zváženo zkrácení doby počítání.

Kompetitivní vazebná analýza

24. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontrolys

25. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a neváže se). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy alespoň třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufru, kontrol, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a roztoků zkoušených chemických látek jsou popsány v odkazu 2 (příloha K, viz protokol pro analýzu FW).

Kontrola s rozpouštědlem:

26. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také celkovou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je ethanol. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu, může být alternativně použit DMSO. Koncentrace ethanolu nebo DMSO, je-li použit, v jamkách pro konečnou analýzu je 1,5 % a nesmí překročit 2 %.

Kontrola s pufrem:

27. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrERα by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17β-estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17β-estradiolu v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí 100 nM–10 pM (od –7[logM] do –11[logM]), a to v těchto rozestupech: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Nejvyšší koncentrace neznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slouží také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

29. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS 68-23-5) nebo norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 3 nM do 30 μM (od –8,5[logM] do –4,5[logM]), a to v těchto rozestupech: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Látka, která se neváže

30. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2 943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat, když se zkoušené chemické látky nenavážou na hrERα. Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 0,1 nM do 1 000 μM (od –10[logM] do –3[logM]), a to v logaritmických přírůstcích. Jako alternativní kontrolní látka, která se neváže, může být použit di-*n*-butylftalát (DBP). Bylo prokázáno, že jeho maximální rozpustnost je–4[logM].

Koncentrace hrERα

31. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu 20 ± 5 % 1 nM radioligandu (viz odstavce 12–13 v dodatku 2). Roztok hrERα je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

[3H]-17β-estradiol

32. Koncentrace [^{3}H]-17β-estradiolu v jamkách by měla být 1,0 nM.

Zkoušené chemické látky

33. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35). Zkoušená chemická látka by měla být testována s použitím 8 logaritmických křivek koncentrací v rozestupech definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

34. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 26 v dodatku 2). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu ani v DMSO a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkumavce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.

35. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.

36. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí log(IC_{50}) zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění (tj. 0,5 log jednotky kolem předpokládané hodnoty log(IC_{50})). Konečný výsledek by měl odrážet dostatečný rozsah koncentrací na každé straně log(IC_{50}), včetně „horní" a „dolní", aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

37. Připraví se označené mikrotitrační destičky pro šestinásobné inkubace s kódy pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci referenčního estrogenu, který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), a kontrolu s pufrem a pro trojnásobné inkubace s kódy pro každou z osmi koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen, osm úrovní koncentrace látky se slabou vazbou a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontrolu je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušené chemické látky se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly, tj. 1) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 2.3. Koncentrace uvedené v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace analýzy. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC_{50} musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

Tabulka 4

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepý pokus (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slepý pokus (pro radioaktivní) (*)			Slepý pokus (pro radioaktivní) (*)			Kontrola s pufrem			Kontrola s pufrem		

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)
(*) skutečně slepý pokus, jamka nepoužita
(*) slepý pokus nepoužitý při inkubaci, ale použitý na potvrzení celkové přidané radioaktivity.

Tabulka 5

Uspořádání mikrotitrační destičky při analýze kompetitivní vazby, celé křivky koncentrace pro zkoušené chemické látky a kontroly

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)

Dokončení analýzy kompetitivní vazby

38. Jak je uvedeno v tabulce 6, přidá se do jamek 80 µl kontroly s rozpouštědlem, kontroly s pufrem, referenční estrogen, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, a zkušební chemické látky připravené ve zkušebním pufru. Poté se do každé jamky přidá 40 µl roztoku 4 nM [3H]-17β-estradiolu. Po mírném otáčení po dobu 10 až 15 minut při teplotě od 2 °C do 8 °C se přidá 40 µl roztoku hrERα. Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2 °C až 8 °C po dobou 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Tabulka 6

Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Objem (µl)	Složka
80	Neznačený 17β-estradiol, norethynodrel, OTES, zkoušené chemické látky, rozpouštědlo nebo pufr
40	roztok 4 nM [^{3}H]-17β-estradiolu
40	roztok hrERα, určená koncentrace
160	*Celkový objem v každé jamce*

39. Poté se provede kvantifikace [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα po separaci [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 80 µl studené suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 20–23 týkajících se saturační vazebné analýzy.

40. Jamky H1–6 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^{3}H]-značeného-estradiolu v 40 µl. Alikvotní množství z 40 µl se přidá přímo do scintilační kapaliny v jamkách H1–H6.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

41. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu, což ukazuje saturaci hrERα ligandem.

42. Specifická vazba při 1 nM [3H]-17β-estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 15 % až 25 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.

43. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.

44. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky < 35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17β-estradiolu občas uvedený limit překročit.

Analýza kompetitivní vazby

45. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17β-estradiolu by měly vytěsnit [^{3}H]-17β- estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.

46. Hodnota IC_{50} pro referenční estrogen (tj. 17β-estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu plus Kd určený ze saturační vazebné analýzy.

47. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 20 ± 5 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 1 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.

48. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.

49. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα při zkoušení do 10^{-3} M (OTES) nebo 10^{-4} M (DBP).

50. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie vazebné analýzy FW hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95 % konfidenční intervaly pro střední hodnotu (n) +/– SD za všechna kontrolní provedení zkoušky ve všech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro $\log_{10}$RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95 % konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, logIC_{50}), které jsou uvedeny jako kritéria funkčnosti pro pozitivní kontroly. V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC_{50} poněkud odlišovat v závislosti na Kd receptorového přípravku a koncentraci ligandu.

51. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, mimo křivku). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu FW a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

52. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.

53. Při analýze dat se určuje B_{max} a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování B_{max} a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Analýza kompetitivní vazby

54. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

55. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a log(IC_{50}) obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 45–50 v tomto dodatku 2.

56. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 55 výše). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

Interpretace údajů

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrERα, jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

58. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrERα, jestliže:

— lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo

— nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

59. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76 a 51 %).

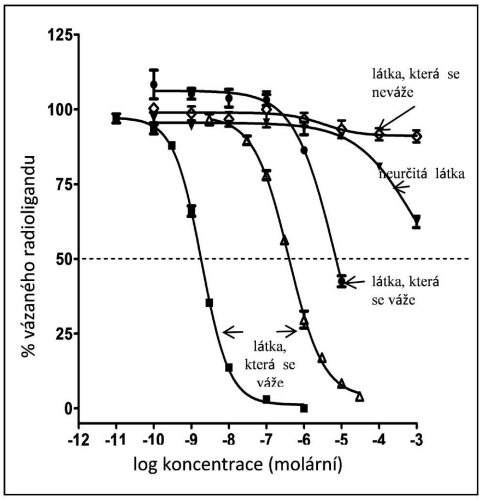
Tabulka 7

Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
váže se[a]	Lze vynést vazebnou křivku. **Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.**
neváže se[b]	Jestliže lze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %.** Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**
Neurčitá[c]	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**

Obrázek 1

Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky



60. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8

Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:	
Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0
Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:	
Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	průměr ≥ 1,5
neurčitá	0,5 ≤ průměr < 1,5
neváže se	průměr < 0,5

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 24 „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody.

Dodatek 2.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia

DCC: aktivní uhlí potažené dextranem

E2: neznačený 17β-estradiol (inertní)

Zkušební pufr: 10 mM Tris, 10 mg bovinního sérového albuminu /ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptinu, pH 7,5

hrERα: lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [^{3}H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

Dodatek 2.2

TYPICKÁ SATURAČNÍ ANALÝZA [^{3}H]-17B-ESTRADIOLU SE TŘEMI REPLIKOVANÝMI JAMKAMI

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami											
Poloha	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Objem radioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem neradioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem receptoru (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami											
Poloha	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Objem radioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem neradioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem receptoru (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem neradioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem pufru (µl)	Objem receptoru (µl)	Celkový objem v jamkách
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	radio-aktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	radio-aktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	radio-aktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	radio-aktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	radio-aktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	radio-aktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	radio-aktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	radio-aktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	radio-aktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	radio-aktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	radio-aktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	radio-aktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	radio-aktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	radio-aktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	radio-aktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	radio-aktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem neradioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem pufru (µl)	Objem receptoru (µl)	Celkový objem v jamkách
H5	2	radio-aktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	radio-aktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	radio-aktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	radio-aktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	radio-aktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	radio-aktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	radio-aktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	radio-aktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 µl se přidává až pro počítání scintilací.

Dodatek 2.3:

USPOŘÁDÁNÍ JAMEK PŘI KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZE

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	A1	1	celková vazba	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
P	A2	2	celková vazba	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
P	A3	3	celková vazba	TB	TB3	–	40		40	80	160	-
P	A4	1	celková vazba	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
P	A5	2	celková vazba	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
P	A6	3	celková vazba	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
P	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	B10	1	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	–	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	slepá zkouška	slepá zkouška	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slepá zkouška	slepá zkouška	B2	–	–	160	–	–	160	–
P	C12	3	slepá zkouška	slepá zkouška	B3	–	–	160	–	–	160	–
P	D1	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	E11	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	H1	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
P	H2	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 µl se přidává až pro počítání scintilací.

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	A1	1	celková vazba	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	celková vazba	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	celková vazba	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	celková vazba	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	celková vazba	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	celková vazba	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	C1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	E1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	G1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Dodatek 3

ANALÝZA VAZBY NA ESTROGENOVÉ RECEPTORY *IN VITRO*S VYUŽITÍM LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO PROTEINU S LIGAND VÁZAJÍCÍ DOMÉNOU PODLE ÚSTAVU PRO HODNOCENÍ A VÝZKUM CHEMICKÝCH LÁTEK (CERI)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturační a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ERα) používá ligand vázající doménu lidského ERα (hrERα). Tato proteinová konstrukce, kterou vytvořil japonský Ústav pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI), existuje jako fúzní protein glutathion-S-transferáza (GST) a je exprimována v *E. coli*. Protokol CERI prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.

2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrERα. Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17β-estradiolu ve vazbě na hrERα-LBD. Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC_{50} (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrERα v porovnání s 17β-estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrERα, látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsaných u vazebných křivek.

3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrERα měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([^{3}H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.

6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).

8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat [^{3}H]17β-estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu (nazývá se „50 % inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu [^{3}H]17β-estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vloží pokud možno do určité formy Hillovy rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrERα

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrERα prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:

— Proveďte saturační vazebnou analýzu [3H]-17β-estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrERα. V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrERα vůči [3H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro konkrétní šarži hrERα.

— Proveďte kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17β-estradiol), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC50 a relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrERα. Dále by parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky měly být v rozmezí 95 % konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1

Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza CERI hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Spodní strana	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillův koeficient	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$logIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Norethynodrel	Horní	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Spodní strana	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillův koeficient	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Norethindrone [c]	Nahoru	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Spodní strana	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillův koeficient	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$logIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Střední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byla vypočítána pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).
[b] 95 % konfidence je uvedena jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.
[c] Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.
Rozsah IC_{50} bude záviset na Kd receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu IC_{50} podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

10. Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagenciemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

11. Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.

12. Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 0,5 nM [^{3}H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,1, 0,2, 0,4 a 0,6 nM inkubovat v nepřítomnosti (úplná vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba, vypočítaná jako rozdíl úplné a nespecifické vazby, se nanese proti nominální koncentraci receptoru. Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 40 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,2 nM.

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 40 % kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 40 % kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^{3}H]17β-estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

a. Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení úplné vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [^{3}H]17β-estradiol.

b. V přítomnosti 2000násobně zvýšené koncentrace neznačeného 17β-estradiolu přes značený 17β-estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17β-estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.

c. Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^{3}H]-17β-estradiolu a neznačeného 17β-estradiolu a hrERα

15. 40 nM roztok [^{3}H]-17β-estradiolu se připraví z 1 μM zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu v DMSO přidáním DMSO (pro přípravu 200 nM) a zkušebního pufru při pokojové teplotě (pro přípravu 40 nM). Pomocí tohoto 40 nM roztoku se připraví série naředěného [^{3}H]-17β-estradiolu v rozmezí od 0,313 nM do 40 nM se zkušebním pufrem při pokojové teplotě (jak je znázorněno ve sloupci 12 tabulky 2). Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0313 do 4,0 nM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (viz tabulky 2 a 3). Příprava zkušebního pufru, výpočet původního zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu podle jeho měrné aktivity, příprava zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu CERI (2).

16. Zředěné roztoky neznačeného 17β-estradiolu se připraví z 1 nM zásobního roztoku 17β-estradiolu přidáním zkušebního pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v počátečním rozsahu od 0,625 μM do 80 μM. Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0625 do 8 μM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky určené pro měření nespecifické vazby (viz tabulky 2 a 3). Příprava roztoků neznačeného 17β-estradiolu je podrobně popsána v protokolu CERI (2).

17. Měla by se použít taková koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu 40±10 % (viz odstavce 12–13). Roztok hrERα se připraví s ledovým zkušebním pufrem bezprostředně před použitím, tj. až po přípravě všech jamek pro celkovou vazbou, nespecifickou vazbu a radioaktivní ligand samotný.

18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu. Přiřazení objemů [^{3}H]-17β-estradiolu, neznačeného 17β-estradiolu, pufru a receptoru je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 2

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Pro měření TB			Pro měření NSB			Pro určení radioaktivního ligandu samotného				Neznačená ředění E2 pro sloupec 4–6	Ředění [^{3}H]E2 pro sloupec 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0.50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB:- celková vazba
NSB:- nespecifická vazba
[^{3}H] E2:- [^{3}H]17β-estradiol
E2:- neznačený 17β-estradiol
(*) Koncentrace zde uvedené jsou konečné koncentrace v každé jamce.
(**) Naředěné roztoky neznačeného E2 a [^{3}H]E2 mohou být připraveny na jiné destičce.

Tabulka 3

Objemy reagencií pro saturační mikrotitrační destičku

Číslo sloupce		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Postup přípravy		Jamky TB			Jamky NSB			Radioaktivní ligand samotný		
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	pufr	60 µl			50 µl			90 µl		
	neznačený E2 ze sloupce 11 v tabulce 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 z řádku 12 v tabulce 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Celkový reakční objem		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubace		**REAKCE PO 2 HODINÁCH INKUBACE**						Kvantifikace radioaktivity ihned po přípravě. Bez inkubace		
Expozice 0,4 % DCC		Ano			Ano			**Ne**		
Objem 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtrace		Ano			Ano			Ne		
MĚŘENÍ DPM										
Do scintilačního koktejlu přidán kvantifikační objem		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jestliže se pro měření dpm používá LSC pro mikrotitrační destičky, není příprava radioaktivního ligandu samotného na stejné experimentální destičce s TB a NSB vhodná. Radioaktivní ligand samotný by měl být připravován na jiné destičce.
(**) Jestliže je k separaci DCC použito odstřeďování, je třeba 50 µl supernatantu změřit pomocí LSC, aby nedošlo ke kontaminaci DCC.

19. Mikrotitrační destičky pro stanovení celkové vazby a nespecifické vazby by se měly inkubovat při pokojové teplotě (22°C až 28°C) po dobu dvou hodin.

Měření [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. Po dvouhodinové inkubaci by měl být [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα separován od volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 100 µl ledové suspenze 0,4 % DCC do jamek. Destičky se poté umístí na led na 10 minut a reakční směs a suspenze DCC se přefiltruje přenesením na filtr mikrotitračních destiček, aby se odstranil DCC. Poté se 100 µl filtrátu přidá do scintilační kapaliny ve scintilačních lahvičkách pro stanovení rozpadů za minutu (dpm) na lahvičku pomocí kapalinového scintilačního spektrometru.

21. Jestliže není k dispozici filtr na mikrotitrační destičky, lze DCC alternativně odstranit odstředěním. Poté se velmi opatrně odebere 50 µl supernatantu obsahujícího [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα, aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a použije se pro počítání scintilací.

22. Pro stanovení rozpadu za minutu (dpm) [^{3}H]-17β-estradiolu přidaného do jamek se použije podmínka radioaktivního ligandu samotného. Radioaktivita se kvantifikuje ihned po přípravě. Tyto jamky se neinkubují a neexponují se suspenzi DCC, ale jejich obsah je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny. Tato měření ukazují, kolik [^{3}H]-17β-estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

Kompetitivní vazebná analýza

23. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontroly

24. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a látka, která se neváže). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění, tj. přibližně úplné vytěsněni radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufru, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a roztoků zkoušených chemických látek jsou podrobně popsány v protokolu CERI (2).

Kontrola s rozpouštědlem:

25. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také úplnou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je DMSO. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO, může být alternativně použit ethanol. Koncentrace DMSO v jamkách při konečné analýze by měla být 2,05 % a může se zvyšovat do 2,5 % v případě nerozpustnosti zkoušené chemické látky. Koncentrace DMSO nad 2,5 % by se neměly prožívat vzhledem k interferenci vyšších koncentrací rozpouštědla s analýzou. U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v DMSO, ale jsou rozpustné v ethanolu, může být při analýze použit bez interference maximálně 2 % ethanol.

Kontrola s pufrem:

26. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrERα by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17β-estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17β-estradiolu v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách, které budou použity pro standardní křivku, budou v těchto rozestupech: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Nejvyšší koncentrace neznačeného 17β-estradiolu (1 μM) by měla sloužit také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

28. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS68-23-5) nebo alternativně norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} a 10^{-9} M.

Látka, která se neváže

29. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat zkoušené chemické látky, které se nevážou na hrERα. Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Jako látka, která se neváže, může být alternativně použit di-n-butylftalát (DBP, CAS 84-72-2), ale může být zkoušen pouze do 10^{-4}M. Bylo prokázáno, že maximální rozpustnost DBP v analýze je 10^{-4} M.

Koncentrace hrERα

30. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu 40±10 % (viz odstavce 12–13 v dodatku 3). Roztok hrERα je třeba připravovat naředěním funkčního hrERα v ledovém zkušebním pufru bezprostředně před použitím.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Konečná koncentrace [^{3}H]-17β-estradiolu v jamkách by měla být 0,5 nM.

Zkoušené chemické látky

32. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a poté dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu zahrnuje kontrolu s rozpouštědlem s alespoň 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo nižší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35 v dodatku 3). Po stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušení by zkoušená chemická látka měla být testována s použitím 8 logaritmických koncentrací v rozestupech vhodně definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měly podle potřeby dále upravit zkoušené koncentrace, aby lépe charakterizovaly křivku závislosti odpovědi na koncentraci, je-li to nezbytné.

33. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 25 v dodatku 3). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO ani v ethanolu a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkumavce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.

34. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.

35. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí log(IC_{50}) zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění blíže kolem předpokládané hodnoty log(IC_{50}) (tj. 0,5 log jednotky). Konečné výsledky by měly ukazovat dostatečný rozsah koncentrací na každé straně log(IC_{50}), včetně „horní“ a „dolní“, aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

36. Připraví se označené mikrotitrační destičky s použitím šestinásobné inkubace pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci referenčního estrogenu (E2), který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), kontrolu s pufrem, trojnásobná inkubace pro každou z osmi koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen (E2), osm koncentrací látky se slabou vazbou (norethynodrel nebo norethindron) a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu uspořádání destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontroly je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušenou chemickou látku se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly (tj. i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem (jako celkovou vazbu) a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 3.3. Koncentrace uvedené v technologickém postupu a v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace použité v každé jamce. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC_{50} musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

Tabulka 4

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze ([1]) ([2]), celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s pufrem a pozitivní kontrola (E2)			Slabá pozitivní (norethynodrel)			Negativní kontrola (OTES)			TB a NSB		
A	Slepý pokus (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s rozpouštědlem) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s pufrem		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Slepý pokus (pro radioaktivní) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Vzorové uspořádání standardní mikrotitrační destičky, které se použije při každém experimentu.
([2]) Nezapomeňte, že tato mikrotitrační destička je připravena s použitím naředěných roztoků z destičky s ředěním uvedeným pro standardy v předchozích částech.
V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).
(*) skutečný slepý pokus, jamka nepoužita
(**) slepý pokus, nepoužito při inkubaci, ale použito na potvrzení celkové dodané radioaktivity.

Tabulka 5

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, další destičky pro zkoušené chemické látky (TC) a kontroly

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Zkoušená chemická látka 1 (TC-1)			Zkoušená chemická látka 2 (TC-2)			Zkoušená chemická látka 3 (TC-3)			Kontroly		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4.5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s rozpouštědlem)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).

Dokončení kompetitivní vazebné analýzy

37. S výjimkou jamek pro celkovou vazbu a slepé pokusy (pro radioaktivní látku), jak je uvedeno v tabulce 6, se do každé jamky dá 50 µl zkušebního pufru a smíchá se s 10 µl kontroly s rozpouštědlem, referenčního estrogenu (E2), látky se slabou vazbou, látky, která se neváže, a zkoušenými chemickými látkami, respektive s 10 µl roztoku 5 nM [3H]-17β-estradiolu. Poté se do každé destičky přidá 30 µl ledového roztoku receptoru a lehce promíchá. Roztok hrERα by měl být poslední přidávanou reagencií. Zkušební mikrotitrační destičky se inkubují při pokojové teplotě (22° až 28°C) po dobu 2 hodin.

Tabulka 6

Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Postup přípravy		Jiné než jamky TB	Jamky TB	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	Zkušební pufr při pokojové teplotě	50 µl	60 µl	90 µl
	Neznačený E2, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, rozpouštědlo a zkoušené chemické látky (*)	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiol pro konečnou koncentraci 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	určená koncentrace hrERα (viz odstavce 12–13)	30 µl	30 µl	–
Celkový objem v každé jamce		100 µl	100 µl	100 µl

(*) správně připravené, aby byla dosažena konečná koncentrace v rámci přijatelné koncentrace rozpouštědla

38. Poté se provede kvantifikace [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα po separaci [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 100 µl ledové suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 21–23 dodatku 3 o saturační vazebné analýze.

39. Jamky G10–12 a H10–12 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^{3}H]-značeného-estradiolu v 10 µl. Alikvotní množství z 10 µl se přidá přímo do scintilační kapaliny.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

40. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu, což ukazuje saturaci hrERα ligandem.

41. Specifická vazba při 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 30 % až 50 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.

42. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.

43. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky <35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17β-estradiolu občas uvedený limit překročit.

Kompetitivní vazebná analýza

44. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17β-estradiolu by měly vytěsnit [^{3}H]-17β- estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.

45. Hodnota IC_{50} pro referenční estrogen (tj. 17β-estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu plus Kd určený ze saturační vazebné analýzy.

46. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 40 ± 10 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 0,5 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.

47. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.

48. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα při zkoušení do 10^{-3} M (OTES) nebo 10^{-4} M (DBP).

49. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie pro vazebnou analýzu CERI hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95 % konfidenční intervaly pro střední hodnotu ± SD (n) za všechna kontrolní provedení zkoušky ve čtyřech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro $\log_{10}$RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95 % konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, log IC_{50}). V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC_{50} poněkud odlišovat v závislosti na experimentálně zjištěné Kd receptorového přípravku a koncentraci ligandu použitého pro analýzu.

50. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, chybějící křivka). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu CERI a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

51. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.

52. Při analýze dat se určuje B_{max} a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování B_{max} a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Kompetitivní vazebná analýza

53. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

54. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a log(IC_{50}) obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 44–49 tohoto dodatku 3.

55. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 54 tohoto dodatku 3). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích zkoušené chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

Interpretace údajů

56. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrERα, jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrERα, jestliže:

— lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo

— nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

58. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

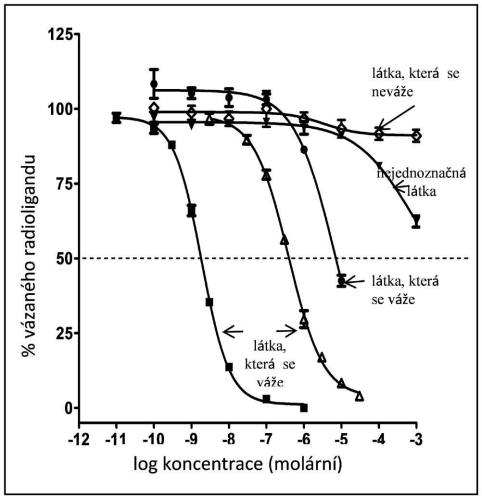
Tabulka 7

Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
Látka, která se váže[a]	Lze vynést vazebnou křivku. **Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.**
Látka, která se neváže[b]	Jestliže lze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %.** Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**
Neurčitá[c]	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

Obrázek 1

Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky



59. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8

Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:

Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0

Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:

Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	průměr ≥ 1,5
neurčitá	0,5 ≤ průměr < 1,5
neváže se	průměr < 0,5

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

60. Viz odstavce 24 „SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER“ této zkušební metody.

Dodatek 3.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia.

DCC: Aktivní uhlí potažené dextranem.

E2: Neznačený 17β-estradiol (inertní).

Zkušební pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, s obsahem 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % glycerolu, 0,2 mM leupeptinu, 1 mM dithiothreitolu a 10 mg/ml bovinního sérového albuminu.

hrERα: Lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa (ligand vázající doména).

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [^{3}H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

Dodatek 3.2

USPOŘÁDÁNÍ JAMEK PŘI KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZE

Mikrodestička	**Poloha**	**Replikát**	**Druh jamky**	**Kód jamky**	**Kód koncentrace**	**Výchozí koncentrace kompetitora (M)**	**Zásobní hrER (µl)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)**	**Objem z destičky s ředěním (µl)**	**Konečný objem (µl)**	**Konečná koncentrace kompetitora (M)**
S	A1	1	Slepý pokus	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Slepý pokus	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Slepý pokus	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	D3	3	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	H4	1	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P	A11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P	A12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P	B10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	B11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Kontrola s pufrem	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Kontrola s pufrem	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Kontrola s pufrem	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Kontrola s pufrem	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Kontrola s pufrem	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Kontrola s pufrem	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10 (*)	1	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H1	-	90	-	10	-	100	-

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	G11 (*)	2	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H2	-	90	-	10	-	100	-
P	G12 (*)	3	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10 (*)	4	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11 (*)	5	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H6	-	90	-	10	-	100	-
P1	A1	1	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	D1	1	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	H3	3	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	E5	2	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	B7	1	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	F9	3	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Kontrolní E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Kontrolní E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Kontrolní E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	C10	1	Kontrolní NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolní NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolní NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	G10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

(*) Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 10 µl se přidává až pro počítání scintilací.

Dodatek 4

POZNÁMKY PRO ANALÝZU DAT Z KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZY HRER

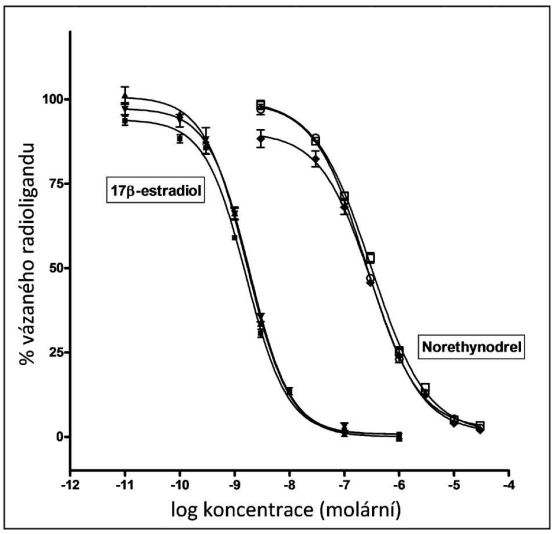
1. Kompetitivní vazebná analýza hrERα měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

ANALÝZA DAT PRO REFERENČNÍ ESTROGEN A LÁTKU SE SLABOU VAZBOU (1)

2. Data z kontrolních provedení zkoušek se transformují (tj. percentuální specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu a log koncentrace kontrolní chemické látky) pro další analýzu. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Při vynášení těchto křivek může být horní bod, dolní bod, sklon a log(IC50) obvykle ponechán bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. U analýz FW nebo CERI hrER nebylo nutné provádět v korekci úbytku ligandu, ale v případě potřeby je možné její provedení zvážit. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebnou afinitu (RBA) pro látku se slabou vazbou lze vypočítat jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy a kritérií přijatelnosti uvedených v této zkušební metodě (odstavec 20), v dodatku 2 (analýza FW, odstavce 41–51) a v dodatku 3 (analýza CERI, odstavce 41–51). Na obrázku 1 jsou uvedeny příklady ze 3 provedení zkoušek na referenční estrogen a látku se slabou vazbou.

Obrázek 1

Příklady křivek kompetitivní vazby pro referenční estrogen a kontrolní látku se slabou vazbou.



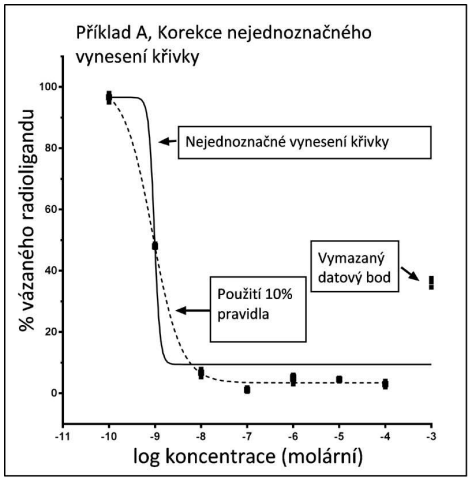
Analýza dat u zkoušených chemických látek

3. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky by mělo nejdříve projít standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou. Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně. Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba používat odborný úsudek a data použitá ke klasifikaci jednotlivých zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou, nebo látek, které se nevážou, by měla být vědecky obhajitelná.

4. Občas se mohou vyskytnout příklady dat, která vyžadují větší pozornost, aby byla data o vazbě hrER správně analyzována a interpretována. Předchozí studie ukázaly případy, kdy může být analýza a interpretace dat o kompetitivní vazbě na receptor komplikovaná v důsledku zvýšení percentuální specifické vazby při testování chemických látek při nejvyšších koncentracích (obrázek 2). Je to známý problém, který se vyskytuje při použití protokolů u řady analýz kompetitivní vazby na receptor (3). V těchto případech je pozorována odpověď závislá na koncentraci při nižších koncentracích, ale s tím, jak se koncentrace zkoušené chemické látky blíží mezi rozpustnosti, vytěsňování [^{3}H]17β-estradiolu již neklesá. V těchto případech data u vyšších koncentrací ukazují, že byla dosažena biologická mez analýzy. Tento jev je například často spojován s nerozpustností a srážením chemické látky při vysokých koncentracích, případně může také odrážet překročení kapacity aktivního uhlí potaženého dextranem zachytávat radioizotopově značený ligand v průběhu separace při nejvyšších koncentracích chemické látky. Ponechání těchto datových bodů při nanášení kompetitivních vazebných dat na sigmoidní křivku může někdy vést k chybné klasifikaci vazebného potenciálu zkoušené chemické látky na ER (obrázek 2). Aby k tomu nedocházelo, zahrnuje protokol pro vazebné analýzy FW a CERI hrER možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu o 10 % nebo více nad průměrem pozorovaným při nižší koncentraci (tj. obvykle se to nazývá pravidlo 10 %). Toto pravidlo lze použít u dané křivky pouze jednou a musí zůstat data pro alespoň 6 koncentrací, aby mohla být křivka správně klasifikována.

Obrázek 2

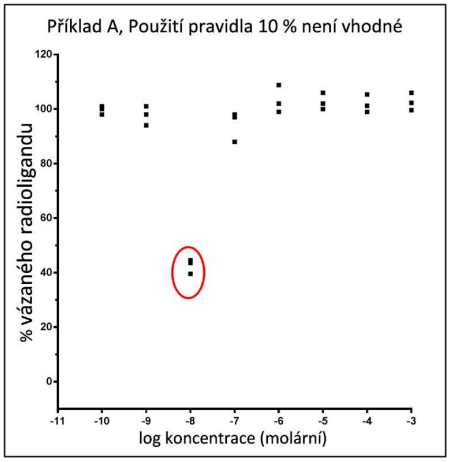
Příklady, kompetitivní vazebné křivky s použitím pravidla 10 % a bez použití tohoto pravidla

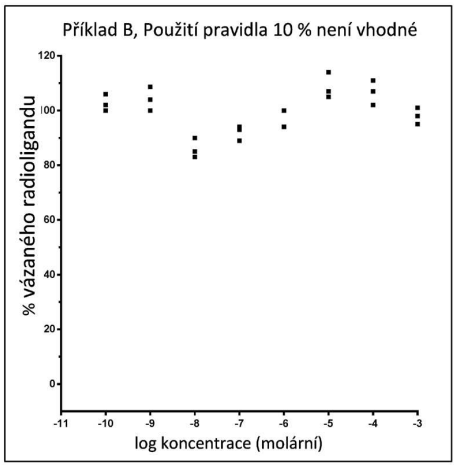


5. Správné použití pravidla 10 % pro korekci těchto křivek by mělo být pečlivě zváženo a vyhrazeno pouze pro ty případy, kde existuje silná indikace, že jde o látku, která se váže na hrER. Při provádění experimentů pro validační studii analýzy vazby FW hrER bylo pozorováno, že pravidlo 10 % má někdy nezamýšlený a nepředpokládaný důsledek. Chemické látky, které nereagovaly s receptorem (tj. skutečné látky, které se nevážou), často vykazovaly variabilitu kolem 100 % vazby radioligandu, což bylo více než 10 % v celém rozmezí zkoušených koncentrací. Pokud se stalo, že nejnižší hodnota byla při nízké koncentraci, mohla být data při použití pravidla 10 % ze všech vyšších koncentrací z analýzy potenciálně vymazána, ačkoliv tyto koncentrace mohly být užitečné při určení, že tato chemická látka se neváže. Na obrázku 3 jsou uvedeny příklady, kdy použití pravidla 10 % není vhodné.

Obrázek 3

Příklady, data o kompetitivní vazbě, kdy použití pravidla 10 % není vhodné





ODKAZY

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71 ANALÝZY SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO* ZAMĚŘENÉ NA KLÍČOVOU UDÁLOST AKTIVACE DENDRITICKÝCH BUNĚK V DRÁZE NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ (AOP) VEDOUCÍCH K SENZIBILIZACI KŮŽE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Zkušební metoda vycházející z klíčové události aktivace dendritických buněk

1. Jako látka senzibilizující kůži se označuje látka, která po styku s kůží vyvolává alergickou odpověď, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]). Existuje všeobecná shoda, pokud jde o klíčové biologické procesy, jež zapříčiňují senzibilizaci kůže. Současné znalosti o chemických a biologických mechanismech souvisejících se senzibilizací kůže byly v rámci programu OECD zkoumajícího dráhy nežádoucích účinků (AOP) (2) shrnuty jako AOP, počínaje molekulární iniciační událostí přes průběžné události až po nepříznivý účinek, a sice alergickou kontaktní dermatitidu. V tomto případě je molekulární iniciační událostí (tj. první klíčová událost) kovalentní vazba elektrofilních látek na nukleofilní centra v kožních proteinech. Druhá klíčová událost v této metodě AOP se odehrává v keratinocytech a zahrnuje zánětlivé odpovědi, jakož i změny v expresi genů spojené se specifickými dráhami buněčné signalizace, např. dráhami závislými na antioxidačním/elektrofilním responzivním elementu (ARE). Třetí klíčovou událostí je aktivace dendritických buněk (DC), typicky hodnocená podle exprese specifických buněčných povrchových markerů, chemokinů a cytokinů. Čtvrtou klíčovou událostí je aktivace a proliferace T buněk, která se nepřímo hodnotí ve zkoušce s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin na myších (LLNA) (3).

2. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 442E (2017). Popisuje analýzy *in vitro*, které se zaměřují na mechanismy popsané v klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže (2). Tato zkušební metoda zahrnuje zkoušky, které se podpůrně používají k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v souladu s GHS OSN a s nařízením CLP.

Zkoušky popsané v této zkušební metodě jsou:

— Zkouška aktivace lidské buněčné linie (h-CLAT)

— Zkouška aktivace buněčné linie U937 (U-SENS™)

— Analýza reportérového genu pro interleukin-8 (analýza IL-8 Luc)

3. Zkoušky zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD se mohou lišit, pokud jde o postup použitý pro generování dat a naměřené hodnoty, ale pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD.

([1]) 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.

Obecné informace a principy zkoušek zahrnutých do této zkušební metody vycházející z klíčové události

4. Hodnocení senzibilizace kůže bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech. Klasické metody, které používají morčata, Magnussonovu-Klingmannovu maximalizační zkoušku na morčatech (GPMT) a Bühlerovu zkoušku (zkušební metoda B.6) (4), hodnotí indukční i provokační fázi senzibilizace kůže. Zkoušky na myších, LLNA (zkušební metoda TM B.42) (3) a její dvě neradioaktivní modifikace, LLNA: DA (zkušební metoda B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (zkušební metoda B.51) (6), posuzují výlučně odpověď na indukci a také se prosadily, neboť ve srovnání se zkouškami na morčatech jsou vhodnější z hlediska dobrého zacházení se zvířaty a objektivního měření indukční fáze senzibilizace kůže.

5. V poslední době byly přijaty mechanisticky založené zkušební metody *in chemico* a *in vitro* zkoumající první klíčovou událost (zkušební metoda B.59; analýza přímé reaktivity peptidů (7)) a druhou klíčovou událost (zkušební metoda B.60; zkušební metoda se stanovením luciferázy ARE-Nrf2 (8)), neboť přispívají k hodnocení potenciální nebezpečnosti chemických látek z hlediska senzibilizace kůže.

6. Zkoušky popsané v této zkušební metodě kvantifikují změnu exprese buněčného povrchového markeru (markerů) spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk po expozici senzibilizujícím látkám (např. CD54, CD86), nebo změny exprese IL-8, cytokinu souvisejícího s aktivací dendritických buněk. Bylo hlášeno, že látky senzibilizující kůži indukují expresi markerů na buněčné membráně, například CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86, vedle indukce prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1β a TNF-α, a několika chemokinů včetně IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), souvisejících s aktivací dendritických buněk (2).

7. Protože však aktivace dendritických buněk představuje pouze jednu klíčovou událost AOP (2) (13), informace získané zkouškami měřícími markery aktivace dendritických buněk nemusí samy o sobě stačit k vyvození závěru o existenci či neexistenci potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže. Proto se navrhuje, aby údaje získané pomocí zkoušek popsaných v této zkušební metodě byly použity jako podpůrné údaje při rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. GHS OSN/CLP kategorie 1) a látkami, které kůži nesenzibilizují, při použití v rámci integrovaných přístupů ke zkouškám a posuzování (IATA), společně s dalšími relevantními doplňujícími informacemi, pocházejícími např. ze zkoušek *in vitro* zkoumajících jiné klíčové události v rámci metody AOP pro stanovení senzibilizace kůže, jakož i z nezkušebních metod včetně údajů odvozených z analogických chemických látek (13). Příklady použití dat získaných z těchto zkoušek v rámci definovaných přístupů, tj. přístupů standardizovaných jak v souvislosti s použitými informačními zdroji, tak i s postupem uplatněným u dat za účelem vypracování předpovědí, byly publikovány (13) a mohou být využity jako užitečné prvky v rámci IATA.

8. Zkoušky popsané v této zkušební metodě nelze používat samy o sobě, a to ani k zařazení látek senzibilizujících kůži do podkategorií 1A a 1B, jak je definuje systém GHS OSN / CLP, ze strany orgánů zavádějících tyto dvě doplňkové podkategorie, ani k predikci účinnosti těchto látek při rozhodování v rámci posuzování bezpečnosti. V závislosti na regulačním rámci však kladné výsledky získané těmito metodami mohou být použity samy o sobě ke klasifikaci chemické látky v kategorii 1 GHS OSN / CLP.

9. Termín „zkoušená chemická látka" se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší ([1]), a nesouvisí s použitelností zkoušek ke zkoušení jednosložkových látek, vícesložkových látek a/nebo směsí. V současnosti jsou k dispozici jen omezené informace o použitelnosti zkoušek ke zkoušení vícesložkových látek/směsí(14) (15). Tyto zkoušky jsou nicméně technicky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak ([2]). Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Při zkoušení vícesložkových látek nebo směsí by se mimoto měly uvážit možné rušivé vlivy cytotoxických složek na pozorované odpovědi.

([1]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka" popisující to, co se zkouší, jednotněji.

([2]) Tato věta byla navržena a schválena na zasedání pracovní skupiny WNT v dubnu 2014.

LITERATURA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupný na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Kapitola B.42 této přílohy: Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin.

(4) Kapitola B.6 této přílohy: Senzibilizace kůže.

(5) Kapitola B.50 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: DA.

(6) Kapitola B.51 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: BrdU-ELISA.

(7) Kapitola B.59 této přílohy: Senzibilizace kůže *in chemico*: zkouška přímé reaktivity peptidů (DPRA).

(8) Kapitola B.60 této přílohy: Senzibilizace kůže *in vitro*: zkušební metoda luciferázou s ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.

Dodatek 1

SENZIBILIZACE KŮŽE IN VITRO: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE (H-CLAT)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška h-CLAT kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů spojené s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie THP-1 po expozici senzibilizujícím látkám (1)(2). Naměřené úrovně exprese buněčných povrchových markerů CD86 a CD54 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.

2. Zkouška h-CLAT byla hodnocena ve validační studii koordinované Referenční laboratoří Evropské unie pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) a následně byla podrobena nezávislé odborné revizi, kterou provedl vědecký poradní výbor (ESAC) EURL ECVAM. S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (3) zkoušku h-CLAT pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů h-CLAT v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. U zkoušky h-CLAT se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 80 % v rámci laboratoří a 80 % mezi laboratořemi (3)(12). Výsledky validační studie (13) a dalších zveřejněných studií (14) celkově ukazují, že v porovnání s výsledky zkušební metody LLNA je přesnost při odlišení kůži senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 85 % (N=142) při citlivosti 93 % (94/101) a specifičnosti 66 % (27/41) (na základě opakované analýzy provedené EURL ECVAM (12) při zohlednění všech stávajících dat, přičemž nebyly brány v úvahu negativní výsledky chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5, jak je uvedeno v odstavci 4). Falešně negativní předpovědi se u zkoušky h-CLAT pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN / CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN / CLP (4)(13)(15). Celkově vzato tyto informace naznačují, že metoda h-CLAT může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti h-CLAT jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (3)(14) (15). Metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek nebo látek, jež tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/ vehikulu (viz odstavec 14). Zkoušené chemické látky s log K_{ow} větším než 3,5 mají tendenci dávat falešně negativní výsledky (14). Negativní výsledky zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 by proto neměly být brány v úvahu. Pozitivní výsledky získané u zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 však přesto mohou být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Z důvodu omezené metabolické schopnosti použité buněčné linie (16) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymů P450) a prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) zejména při nízké míře oxidace rovněž vykazovat negativní výsledky ve zkoušce h-CLAT (15). Zkouškou h-CLAT (17) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC nebo PI. V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC (viz odstavec 24) nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 1-2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly negativní výsledky interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost metody h-CLAT na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

5. Jak bylo popsáno výše, metoda h-CLAT pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (4)(5)(9), je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky h-CLAT potenciálně přispět k posuzování potence, nicméně bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

6. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Metoda h-CLAT je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie, na buňkách THP-1 po 24hodinové expozici zkoušené chemické látce. Tyto povrchové molekuly jsou typickými markery aktivace monocytických THP-1 a mohou napodobovat aktivaci DC, která hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese povrchových markerů se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk protilátkami značenými fluorochromem. Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity, aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up-regulaci exprese povrchových markerů. Relativní intenzita fluorescence povrchových markerů v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 26) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 1.2. Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 20–22) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 158 (18), což je protokol použitý při validační studii provedené za koordinace EURL ECVAM. Při provádění a používání metody h-CLAT v laboratoři se doporučuje použít tento protokol. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů metody h-CLAT, která zahrnuje dva kroky: *analýza pro stanovení dávky* a *měření exprese CD86/CD54*.

Příprava buněk

10. Metoda h-CLAT se používá s buněčnou linií lidské monocytární leukémie THP-1. Doporučuje se, aby byly buňky (TIB-202™) pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.

11. Buňky THP-1 se kultivují při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v médiu RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoethanolu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Použití penicilinu a streptomycinu v kultivačním médiu může být vynecháno. V takovém případě by si však uživatelé měli ověřit, že nepřítomnost antibiotik v kultivačním médiu nemá žádný vliv na výsledky, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2. Aby se minimalizovalo riziko kontaminace, měly by být v každém případě dodržovány správné postupy při kultivaci buněk nezávisle na tom, zda kultivační médium obsahuje antibiotika. Buňky THP-1 se rutinně nasazují každé 2–3 dny v hustotě 0,1 až 0,2 × 10^6 buněk/ml. Udržují se při hustotě 0,1 až 1,0 × 10^6 buněk/ml. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivních kontrol, 2,4-dinitrochlorobenzenu (DNCB) (CAS č. 97-00-7, čistota ≥ 99 %) a síranu nikelnatého ($NiSO_4$) (CAS č. 10101-97-0, čistota ≥ 99 %), a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS č. 50-21-5, čistota ≥ 85 %), a to dva týdny po rozmrazení. DNCB i $NiSO_4$ by měly dát pozitivní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54 a LA by měla dát negativní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54. Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až dva měsíce po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 30. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 20–24.

12. Pro zkoušení se buňky THP-1 nasadí v hustotě 0,1 × 10^6 buněk/ml nebo 0,2 × 10^6 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 72 hodin, respektive 48 hodin. Je důležité, aby byla hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci pokud možno stejná při každém experimentu (použitím jedné ze dvou podmínek předběžné kultivace popsaných výše), protože hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci by mohla ovlivnit expresi CD86/CD54 indukovanou alergeny (19). V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 2 × 10^6 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 24jamkové destičky s plochým dnem (500 µl, 1 × 10^6 buněk/jamku) nebo do 96jamkové destičky s plochým dnem (80 µl, 1,6 × 10^5 buněk/jamku).

Analýza ke stanovení dávky

13. Analýza ke stanovení dávky se provádí za účelem stanovení CV75, což je koncentrace zkoušené chemické látky, která dává 75 % životaschopnost buněk (CV) v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem. Hodnota CV75 se používá ke stanovení koncentrace zkoušených chemických látek pro měření exprese *CD86/CD54* (viz odstavce 20–24).

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro metodu h-CLAT se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují (viz také odstavec 4) ve fyziologickém roztoku nebo médiu jako rozpouštědle/vehikulu první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota ≥ 99 %) jako v rozpouštědle/vehikulu druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná nebo netvoří stabilní disperzi v předchozích dvou rozpouštědlech/vehikulech, na finální koncentraci 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO). Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědle/vehikulu.

15. Z počátečních 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO) zásobních roztoků zkoušených chemických látek se připraví tyto zředěné roztoky:

— Pro fyziologický roztok nebo médium jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí padesátinásobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Jestliže je nejvyšší konečná koncentrace na destičce 1 000 µg/ml netoxická, je třeba znovu stanovit maximální koncentraci provedením nové zkoušky cytotoxicity. Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5 000 µg/ml zkoušených chemických látek rozpuštěných nebo stabilně dispergovaných ve fyziologickém roztoku nebo médiu.

— Pro DMSO jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí 250násobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 1 000 µg/ml ani v případě, že je tato koncentrace netoxická.

Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu pracovního roztoku do objemu buněčné suspenze THP-1 na destičce (viz také odstavec 17), čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění) obvykle je konečný rozsah koncentrací na destičce 7,81–1 000 µg/ml).

16. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u metody h-CLAT používá kultivační médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované (viz odstavec 4) v médiu nebo ve fyziologickém roztoku) nebo DMSO (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO) zkoušené v jedné konečné koncentraci na destičce 0,2 %. Provede se stejné ředění, jak je popsáno u pracovních roztoků v odstavci 15.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kultivační médium nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 15 a 16 se smíchají 1:1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 24jamkové nebo 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu 24 ± 0,5 hodin při teplotě 37°C za přítomnosti 5 % CO_2. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí (20).

Barvení propidiumiodidem (PI)

18. Po 24 ± 0,5 hodinách expozice se buňky přenesou do zkumavek a odeberou se odstředěním. Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se resuspendují s 200 µl (u 96jamkové destičky) nebo 600 µl (u 24jamkové destičky) fosfátového pufru obsahujícího 0,1 % bovinního sérového albuminu (barvicí pufr). 200 µl buněčné suspenze se přenese do 96jamkové destičky s oblým dnem (u 96jamkové destičky) nebo do mikrozkumavky (u 24jamkové destičky) a dvakrát se promyje 200 µl (u 96jamkové destičky) nebo 600 µl (u 24jamkové destičky) barvicího pufru. Nakonec se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 µl) a přidá se roztok PI (např. 20 µl) (konečná koncentrace PI činí například 0,625 µg/ml). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), trypanová modř či jiné, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.
Měření cytotoxicity pomocí průtokové cytometrie a odhad hodnoty CV75

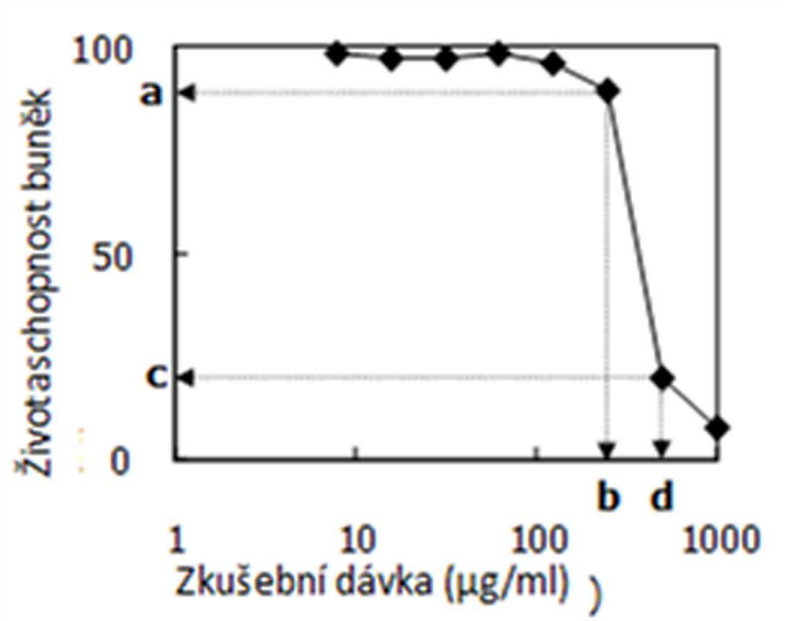
19. Příjem PI se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-3. Připraví se celkem 10 000 živých buněk (PI negativních). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, je třeba připravit až 30 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$\textit{Životaschopnost buněk} = \frac{\textit{Počet živých buněk}}{\textit{Celkový počet požadovaných buněk}} \times 100$$

Hodnota CV75 (viz odstavec 13), tj. koncentrace vykazující 75 % přežití buněk THP-1 (25 % cytotoxicita), se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Kde:
a je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 75 %
c je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 75 %
b a d jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk a, respektive c



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV75, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

Měření exprese CD86/CD54

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

20. Použije se vhodné rozpouštědlo/vehikulum (fyziologický roztok, médium nebo DMSO; viz odstavec 14) na rozpuštění nebo stabilní dispergování zkoušených chemických látek. Zkoušené chemické látky se nejprve naředí na koncentraci odpovídající 100násobku (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 500násobku (pro DMSO) hodnoty 1,2 × CV75 stanovené v *analýze pro zjištění dávky* (viz odstavec 19). Jestliže nelze stanovit hodnotu CV75 (tj. když v *analýze pro zjištění dávky* není pozorována dostatečná cytotoxicita), použije se jako výchozí koncentrace nejvyšší rozpustná nebo stabilně dispergovaná koncentrace zkoušené chemické látky připravená s každým rozpouštědlem/vehikulem. Nezapomeňte, že konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5 000 μg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1 000 μg/ml (v případě DMSO). Poté se připraví 1,2násobným sériovým ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula zásobní roztoky (osm koncentrací v rozsahu od 100×1,2 × CV75 do 100×0,335 × CV75 (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo od 500×1,2 × CV75 do 500×0,335 × CV75 (pro DMSO)), které budou testovány metodou h-CLAT (viz protokol DB-ALM č. 158, kde je uveden příklad dávkování). Zásobní roztoky se poté dále naředí 50násobně (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 250násobně (pro DMSO) na kultivační médium (pracovní roztoky). Tyto pracovní roztoky se nakonec použijí pro expozici s dalším konečným dvojnásobným ředicím faktorem na destičce. Jestliže výsledky nesplňují kritéria přijatelnosti popsaná v odstavcích 29 a 30, pokud jde o životaschopnost buněk, může být zopakována *analýza ke stanovení dávky*, aby se určila přesnější hodnota CV75. Nezapomeňte, že pro měření exprese CD86/CD54 mohou být použity pouze 24jamkové destičky.

21. Připraví se kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, jak bylo popsáno v odstavci 16. Jako pozitivní kontrola se u metody h-CLAT používá DNCB (viz odstavec 11), přičemž zásobní roztoky se připraví v DMSO a naředí podle popisu ředění zásobních roztoků uvedeného v odstavci 20. Jako pozitivní kontrola pro *měření exprese CD86/CD54* se používá DNCB v jedné konečné koncentraci na destičce (obvykle 4,0 μg/ml). Pro získání koncentrace DNCB na destičce 4,0 μg/ml se připraví 2 mg/ml zásobního roztoku DNCB v DMSO, který se dále naředí 250násobně s kultivačním médiem na 8 μg/ml pracovního roztoku. Alternativně může být použita jako koncentrace pozitivní kontroly také hodnota CV75 DNCB, která se stanoví v každém zkušebním zařízení. Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Jedna konečná koncentrace na destičce u pozitivních kontrol by neměla přesahovat 5 000 μg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1 000 μg/ml (v případě DMSO). Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako kritéria přijatelnosti popsaná pro zkoušenou chemickou látku (viz odstavec 29), s výjimkou posledního kritéria přijatelnosti, neboť pozitivní kontrola se testuje v jedné koncentraci.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

22. U každé zkoušené chemické látky a kontrolní látky je pro předpověď potřebný jeden experiment. Každý experiment sestává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky pro *měření exprese CD86/CD54* (viz odstavce 26-28). Každé nezávislé opakování se provádí v různý den nebo ve stejný den, pokud pro každé nezávislé provedení zkoušky: a) jsou připraveny nezávislé čerstvé zásobní roztoky zkoušené chemické látky a roztoky protilátek a b) jsou použity nezávisle sebrané buňky (tj. buňky se sbírají z různých kultivačních baněk); buňky však mohou pocházet ze stejné pasáže. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky připravené jako pracovní roztoky (500 μl) se smíchají s 500 μl suspendovaných buněk ($1x10^6$ buněk) v poměru 1: 1 a buňky se inkubují po dobu 24 ± 0,5 hodiny, jak je popsáno v odstavcích 20 a 21. Při každém provedení zkoušky stačí jeden replikát pro každou koncentraci zkoušené chemické látky a kontrolní látky, protože predikce se získává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky.

Barvení a analýza buněk

23. Po 24±0,5 hodinách expozice se buňky přenesou z 24jamkové destičky do zkumavek, odeberou se odstředěním a poté se dvakrát promyjí 1 ml barvicího pufru (v případě potřeby může být provedeno další promytí). Po promytí se počet buněk upraví 600 μl tlumivého roztoku (barvicí pufr obsahující 0,01 % (m/v) globulinu (Cohnova frakce II, III, lidský; SIGMA, #G2388-10G nebo ekvivalentní)) a inkubují se při 4°C po dobu 15 min. Po úpravě počtu se buňky rozdělí na tři díly po 180 μl do 96jamkové destičky s oblým dnem nebo mikrozkumavky.

24. Po odstředění se buňky barví 50 μl protilátky anti-CD86, anti-CD54 nebo myší IgG1 protilátky (izotyp) značené FITC při 4°C po dobu 30 min. Protilátky popsané v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18) se používají po naředění 3:25 obj. (pro CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) nebo 3:50 obj. (pro CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, #X0927)) v barvicím pufru. Vývojáři zkoušky definovali tyto ředicí faktory protilátek jako faktory, které poskytují nejlepší odstup signálu od šumu. Podle zkušeností vývojářů zkoušek je

intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Mohou být použity jiné protilátky anti-CD86 a/nebo anti-CD54 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Je třeba poznamenat, že změna klonu nebo dodavatele protilátek, které jsou popsány v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18), může ovlivnit výsledky. Po dvojím nebo vícenásobném promytí 150 µl barvicího pufru se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 µl) a přidá se roztok PI (např. 20 µl pro dosažení konečné koncentrace 0,625 µg/ml) nebo roztok jiného markeru cytotoxicity (viz odstavec 18). Úrovně exprese CD86 a CD54 a životaschopnosti buněk se analyzují pomocí průtokové cytometrie.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

25. Exprese CD86 a CD54 se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-1. Na základě geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) se vypočítá relativní intenzita fluorescence (RFI) CD86 a CD54 pro buňky pozitivní kontroly (ctrl) a buňky exponované chemické látce podle této rovnice:

$$RFI = \frac{MFI\ buněk\ exponovaných\ chem.látce - MFI\ kontrolních\ buněk\ izotypu\ exponovaných\ chem.látce}{MFI\ ctrl\ buněk\ exponovaných\ ředidlu/vehikulu - FI\ ctrl\ buněk\ izotypu\ exponovaných\ ředidlu/vehikulu} \times 100$$

Podle rovnice uvedené v odstavci 19 se vypočítá také životaschopnost buněk z kontrolních (ctrl) buněk izotypu (které jsou obarveny myšími IgG1 (izotyp) protilátkami).

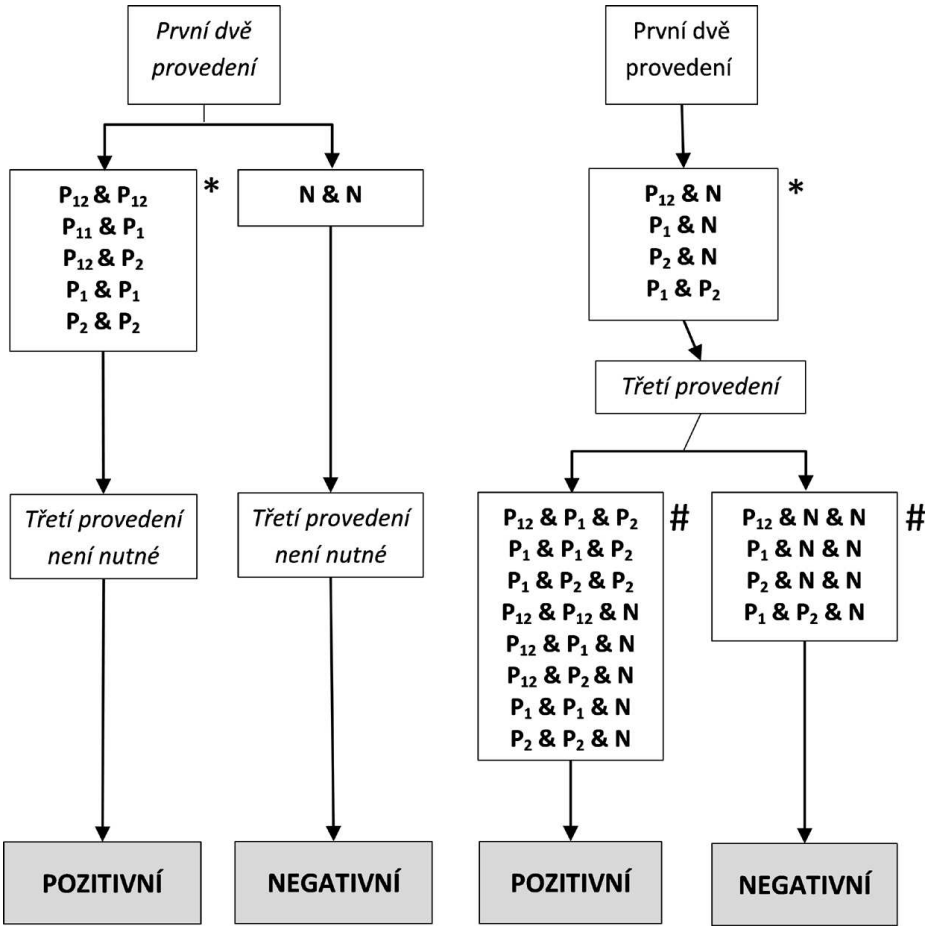
Predikční model

26. Pro měření exprese *CD86/CD54* se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve dvou nezávislých provedeních zkoušky, z nichž se odvodí jedna předpověď (POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ). Předpověď získaná zkouškou h-CLAT se považuje za POZITIVNÍ, je-li splněna alespoň jedna z následujících podmínek ve 2 ze 2 opakování nebo alespoň ve 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky, jinak se předpověď získaná zkouškou h-CLAT považuje za NEGATIVNÍ (obrázek 1):

— RFI u CD86 se rovná nebo je větší než 150 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %);

— RFI u CD54 se rovná nebo je větší než 200 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %).

27. Pokud jsou první dvě provedení zkoušky u CD86 pozitivní anebo jsou pozitivní pro CD54, považuje se předpověď získaná zkouškou h-CLAT za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné. Podobně, pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní, považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ (při zohlednění ustanovení odstavce 30), aniž by bylo nutné opakovat zkoušku potřetí. Pokud však první dvě provedení zkoušky nejsou shodné alespoň u jednoho z markerů (CD54 nebo CD86), je třeba provést zkoušku potřetí, přičemž konečná předpověď bude vycházet z většinového výsledku těchto tří jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3). V této souvislosti je třeba poznamenat, že pokud se provedou první dvě nezávislé zkoušky a jedna je pozitivní pouze pro CD86 (dále jen P_1) a druhá je pozitivní pouze pro CD54 (dále jen P_2), je třeba provést zkoušku potřetí. Jestliže je toto třetí provedení zkoušky negativní pro oba markery (dále jen N), považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ. Jestliže je však toto třetí provedení zkoušky pozitivní pro jeden z markerů (P_1 nebo P_2) nebo pro oba markery (dále jen P_{12}), považuje se předpověď h-CLAT za POZITIVNÍ.



Obrázek 1: Predikční model používaný při metodě h-CLAT. Předpověď h-CLAT by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanovením odstavců 7 a 8 Všeobecného úvodu.

P_1: provedení zkoušky pozitivní pouze u CD86; P_2; provedení zkoušky pozitivní pouze u CD54; P_{12}: provedení zkoušky pozitivní u CD86 i CD54; N: provedení zkoušky není pozitivní u CD86 ani CD54.

*Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků z prvních dvou provedení zkoušky, a to nezávisle na pořadí jejich získání.

#Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše, ale nevyjadřují pořadí jejich získání.

28. Pro zkoušené chemické látky, které jsou na základě metody h-CLAT považovány za POZITIVNÍ, lze doplňkově stanovit dvě hodnoty účinné koncentrace (EC), EC150 pro CD86 a EC200 pro CD54, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukují RFI 150 nebo 200. Tyto hodnoty EC mohou však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (9), jsou-li používány v rámci integrovaných přístupů, například IATA (4) (5) (6) (7) (8). Vypočítají se pomocí této rovnice:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

kde

A_{conc} je nejnižší koncentrace v µg/ml s RFI > 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{conc} je nejvyšší koncentrace v µg/ml s RFI < 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

A_{RFI} je RFI při nejnižší koncentraci s RFI > 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{RFI} je RFI při nejvyšší koncentraci s RFI < 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

Pro účely přesnějšího odvození hodnot EC150 a EC200 mohou být potřebná tři nezávislá provedení *měření expres*e *CD86/CD54*. Poté se stanoví konečné hodnoty EC150 a EC200 jako medián hodnot EC vypočtených ze tří nezávislých provedení zkoušky. Pokud kritéria pozitivity splňují pouze dvě ze tří nezávislých provedení zkoušky (viz odstavce 26-27), použije se vyšší ze dvou vypočtených hodnot EC150 nebo EC200.

Kritéria přijatelnosti

29. Při používání metody h-CLAT by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (22) (27).

— Životaschopnost buněk u kontroly s médiem a kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by měla být vyšší než 90 %.

— Při kontrole s rozpouštědlem/vehikulem by hodnoty RFI u CD86 i CD54 neměly překročit pozitivní kritéria (CD86 RFI ≥ 150 % a CD54 RFI ≥ 200 %). Hodnoty RFI kontroly s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítají podle vzorce uvedeného v odstavci 25 („MFI chemické látky“ se nahradí „MFI rozpouštědla/vehikula“ a „MFI rozpouštědla/vehikula“ se nahradí „MFI kontroly (s médiem)“).

— U kontroly s médiem i kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by mělo být procento MFI u CD86 i CD54 > 105 % kontroly izotypu.

— Při pozitivní kontrole (DNCB) by hodnoty RFI u CD86 i CD54 měly splňovat pozitivní kritéria (CD86 RFI ≥ 150 a CD54 RFI ≥ 200) a životaschopnost buněk by měla být větší než 50 %.

— U zkoušené chemické látky by životaschopnost buněk měla být větší než 50 % alespoň u čtyř testovaných koncentrací při každém provedení zkoušky.

30. Negativní výsledky jsou přijatelné pouze u zkoušených chemických látek, které vykazují životaschopnost buněk menší než 90 % při nejvyšší zkoušené koncentraci (tj. 1.2 × CV75 podle schématu sériového ředění popsaného v odstavci 20). Jestliže se životaschopnost buněk při 1,2 × CV75 rovná nebo je vyšší než 90 %, je třeba negativní výsledek vyřadit. V takovém případě se doporučuje pokusit se zpřesnit výběr dávky zopakováním stanovení hodnoty CV75. Je třeba poznamenat, že když se jako maximální experimentální koncentrace zkoušené chemické látky použije 5 000 μg/ml ve fyziologickém roztoku (nebo médiu či jiných rozpouštědlech/vehikulech), 1 000 μg/ml v DMSO nebo nejvyšší rozpustná koncentrace, je negativní výsledek přijatelný i v případě, že je životaschopnost buněk nad 90 %.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— případně fyzický vzhled, log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

— použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

— životaschopnost buněk, hodnoty MFI a RFI získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk a hodnoty RFI získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

Zkušební postup

— počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis všech změn zkušebního postupu.

Výsledky

— údaje ve formě tabulky, včetně CV75 (v relevantních případech), jednotlivých geometrických hodnot MFI, RFI, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150/EC200 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu;

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných pomocí metody h-CLAT;

— diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. Chem. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. Chem. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostupné na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. Chem. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL-ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupné na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupné na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Dodatek 1.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (21).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (22).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV75: odhad koncentrace ukazující 75 % životaschopnost buněk.

EC150: koncentrace ukazující hodnoty RFI 150 v expresi CD86.

EC200: koncentrace ukazující hodnoty RFI 200 v expresi CD54.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozměněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Kontrola s médiem: neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relativní intenzita fluorescence (RFI): relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s hodnotou MFI v buňkách exponovaných rozpouštědlu/vehikulu.

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) zkoušky (21).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (21).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkoušky, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkoušky (21).

Barvicí pufr: fosfátový pufr obsahující 0,1 % bovinního sérového albuminu.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (21).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (23).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (21).

Dodatek 1.2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi h-CLAT u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV75, EC150 a EC200, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané metodou h-CLAT. Pro metodu h-CLAT jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (3) (14).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k používání metody h-CLAT

Látky pro prokázání způsobilosti	CASRN	Skupenství	Předpověď *in vivo* (1)	CV75 Odkaz Rozsah v μg/ml (2)	Výsledky h-CLAT pro CD86 (referenční rozmezí EC150 v μg/ml) (2)	Výsledky h-CLAT pro CD54 (referenční rozmezí EC200 v μg/ml) (2)
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	senzibilizující (extrémně)	2–12	pozitivní (0,5–10)	pozitivní (0,5–15)
benzen-1,4-diamin	106-50-3	pevná látka	senzibilizující (silně)	5–95	pozitivní (< 40)	negativní (> 1,5) (3)
síran nikelnatý	10101-97-0	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–500	pozitivní (< 100)	pozitivní (10–100)
2-merkaptbenzothiazol	149-30-4	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–400	negativní (> 10) (3)	pozitivní (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	kapalina	senzibilizující (slabě)	> 20	negativní (> 5) (3)	pozitivní (< 250)
imidazolidinyl urea	39236-46-9	pevná látka	senzibilizující (slabě)	25–100	pozitivní (20–90)	pozitivní (20–75)
propan-2-ol	67-63-0	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	1 500–5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	pevná látka	není senzibilizující	> 1 000	negativní (>1 000)	negativní (> 1 000)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Předpovědi nebezpečnosti a potence *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (3) (14). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (24).

(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (13) (25).

(3) Doposud byla většina negativních výsledků získána u tohoto markeru, a proto se většinou očekává negativní výsledek. Uvedené rozmezí bylo definováno na základě několika doposud pozorovaných pozitivních výsledků. V případě pozitivního výsledku by měla být hodnota EC v rámci uvedeného referenčního rozmezí.

Dodatek 2

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE U937 (U-SENS™)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška U-SENS™ kvantifikuje změnu exprese buněčného povrchového markeru spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86) v buněčné linii lidského histiocytického lymfomu U937 po expozici senzibilizujícím látkám (1). Naměřené úrovně exprese buněčného povrchového markeru CD86 v buněčné linii U937 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.

2. Zkouška U-SENS™ byla hodnocena ve validační studii (2) koordinované společností L'Oreal a poté podrobena odborné revizi poradního výboru (ESAC) referenční laboratoře EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) (3). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (4) zkoušku U-SENS™ pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. OECD ve svých pokynech k předkládání zpráv o strukturovaných přístupech k integraci a individuálním zdrojům informací používaným v rámci postupu IATA pro senzibilizaci kůže v současné době rozebírá řadu případových studií popisujících různé strategie zkoušení a predikční modely. Jeden z různých definovaných přístupů vychází z analýzy U-SENS (5). Příklady využití údajů U-SENS™ v kombinaci s jinými informacemi, včetně dosavadních údajů a stávajících platných údajů o humánním použití (6), jsou uvedeny také jinde v odborné literatuře (4) (5) (7).

3. U zkoušky U-SENS™ se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 90 % v rámci laboratoří a 84 % mezi laboratořemi (8). Výsledky validační studie (8) a dalších zveřejněných studií (1) celkově ukazují, že přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek činí 86 % (N=166) při citlivosti 91 % (118/129) a specifičnosti 65 % (24/37) ve srovnání s výsledky zkušební metody LLNA. V porovnání s výsledky při humánním použití je přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 77 % (N=101) při citlivosti 100 % (58/58) a specifičnosti 47 % (20/43). V porovnání s metodou LLNA se falešně negativní předpovědi u zkoušky U-SENS™ pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkově vzato tyto informace naznačují, že zkouška U-SENS™ může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti U-SENS™ jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě údajů, které jsou v současné době k dispozici, bylo prokázáno, že zkouška U-SENS™ je použitelná u zkoušených chemických látek (včetně složek kosmetických přípravků, například konzervantů, povrchově aktivních látek, účinných látek, barviv) spadajících do nejrůznějších organických funkčních skupin, majících různé fyzikálně chemické vlastnosti, různou schopnost vyvolávat senzibilizaci kůže (podle stanovení ve studiích *in vivo*) a různé spektrum reakčních mechanismů, o nichž je známo, že souvisí se senzibilizací kůže (tj. Michaelův akceptor, vznik Schiffovy báze, agens acylového přenosu, nukleofilní bimolekulární substituce [SN2] nebo nukleofilní aromatická substituce [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Metodu U-SENS™ lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek, které jsou rozpustné nebo které tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/vehikulu (viz odstavec 13). Chemické látky ve skupině uvedené jako prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) nebo prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymu P450) byly ve zkoušce U-SENS™ předpovězeny správně (1) (10). Látky narušující membránu mohou vést k falešně pozitivním výsledkům v důsledku nespecifického zvýšení exprese CD86, neboť 3 ze 7 falešně pozitivních výsledků u referenční klasifikace *in vivo* se

týkaly povrchově aktivních látek (1). Proto je třeba pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek posuzovat opatrně, zatímco negativní výsledky u povrchových látek přesto mohou být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Zkouškou U-SENS™ (1) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC (potenciálně falešně negativní) nebo PI (životaschopnost neměřitelná). V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 2.2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek a negativní výsledky u silně fluorescenčních zkoušených chemických látek interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost zkoušky U-SENS™ na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

5. Jak bylo popsáno výše, zkouška U-SENS™ pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence, je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky U-SENS™ potenciálně přispět k posuzování potence, však bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

6. Definice jsou uvedeny v dodatku 2.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška U-SENS™ je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 na buněčné linii lidského histiocytického lymfomu, buňkách U937, po 45±3 hodinách expozice zkoušené chemické látce. Povrchový marker CD86 je jedním z typických markerů aktivace U937. O markeru CD86 je známo, že je kostimulační molekulou, která může napodobovat aktivaci monocytů, což hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk obvykle protilátkami značenými fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity (např. pomocí PI), aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up regulaci exprese buněčného povrchového markeru CD86. Stimulační index (S.I.) buněčného povrchového markeru CD86 v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 19) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 2.2, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (11). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 15–16) a používat tato data k potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 183 (12) pro U-SENS™. Při zavádění a používání zkoušky U-SENS™ v laboratoři by měly být využívány standardní pracovní postupy. Na provádění zkoušky U-SENS™ může být využit automatizovaný systém, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytuje podobné výsledky. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušky U-SENS™.

Příprava buněk

10. Zkouška U-SENS™ se používá s buněčnou linií lidského histiocytického lymfomu U937 (13). Buňky (klon CRL1593.2) by měly být pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.

11. Buňky U937 se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v médiu RPMI-1 640 doplněném 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 μg/ml streptomycinu (kompletní médium). Buňky U937 se rutinně pasážují každé 2–3 dny v hustotě 1,5, respektive 3×10^5 buněk/ml. Hustota buněk by neměla přesahovat 2×10^6 buněk/ml a životaschopnost buněk měřená vyloučením trypanové modři by měla být ≥ 90 % (nepoužije se při první pasáži po rozmrazení). Než se použijí pro zkoušení, je třeba provedením kontroly reaktivity zjistit, zda jsou všechny šarže buněk, FCS nebo protilátek vhodné. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivní kontroly, kyseliny picrylsulfonové (kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, čistota ≥ 99 %) a negativní kontrola pomocí kyseliny mléčné (LA) (CASRN 50-21-5, čistota ≥ 85 %), alespoň jeden týden po rozmrazení. Při kontrole reaktivity je třeba pro každou ze dvou kontrol otestovat šest konečných koncentrací (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). TNBS rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát pozitivní a na koncentraci závislou odpověď CD86 (např. když po pozitivní koncentraci, stimulační index CD86 ≥ 150, následuje koncentrace s rostoucím stimulačním indexem CD86) a LA rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát negativní odpověď CD86 (viz odstavec 21). Pro analýzu se používají pouze šarže buněk, které dvakrát prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až sedm týdnů po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 21. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 18–22.

12. Pro zkoušení se buňky U937 nasadí v hustotě 3×10^5 buněk/ml nebo 6×10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 2 dnů, respektive 1 dne. Mohou být použity jiné podmínky předběžné kultivace, než je uvedeno výše, pokud je uvedeno dostatečné vědecké zdůvodnění a lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytují podobné výsledky. V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 5×10^5 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem s 100 μl (konečná hustota buněk $0,5 \times 10^5$ buněk/jamku).

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

13. Před zkoušením se provede posouzení rozpustnosti. Za tímto účelem se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují při koncentraci 50 mg/ml v kompletním médiu jako rozpouštědle první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota ≥ 99 %) jako v rozpouštědle druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná v kompletním médiu jako rozpouštědle/vehikulu. Pro zkoušení se zkoušená chemická látka rozpustí na konečnou koncentraci 0,4 mg/ml v kompletním médiu, jestliže je chemická látka rozpustná v tomto rozpouštědle/vehikulu. Pokud je chemická látka rozpustná pouze v DMSO, rozpustí se na koncentraci 50 mg/ml. Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědle/vehikulu.

14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, při prvním provedení zkoušky se testuje 6 konečných koncentrací (1, 10, 20, 50, 100 a 200 μg/ml) v odpovídajícím rozpouštědle/vehikulu, a to buď v kompletním médiu, nebo v 0,4 % DMSO v médiu. Pro další provedení zkoušky, od 0,4 mg/ml v kompletním médiu nebo od 50 mg/ml v DMSO, se s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula připraví alespoň 4 pracovní roztoky zkoušených chemických látek (tj. alespoň 4 koncentrace). Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu buněčné suspenze U937 (viz odstavec 11 výše) do objemu pracovního roztoku na destičce, čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění (12). Koncentrace (alespoň 4 koncentrace) pro případné další provedení zkoušky se zvolí na základě jednotlivých výsledků všech předchozích provedení zkoušky (8). Použitelné konečné koncentrace jsou 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 a 200 μg/ml. Maximální konečná koncentrace je 200 μg/ml. V případě, že je pozorována pozitivní hodnota CD86 při 1 μg/ml, hodnotí se 0,1 μg/ml, aby byla zjištěna koncentrace zkoušené chemické látky, která nevyvolává CD86 nad pozitivní prahovou hodnotu. Pro každé provedení zkoušky se vypočítá EC150 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 150 % pozitivní prahové hodnoty CD86, viz odstavec 19), jestliže je pozorována odpověď na pozitivní koncentraci CD86. Pokud zkoušená chemická látka

indukuje pozitivní odpověď CD86, která nezávisí na koncentraci, nemusí být výpočet EC150 relevantní, jak je uvedeno v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12). Pro každé provedení zkoušky se vypočítá CV70 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 70 % prahové hodnoty cytotoxicity, viz odstavec 19) (12). Pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 se zvolí jakékoli koncentrace z použitelných koncentrací rovnoměrně rozdělené mezi EC150 (neboli nejvyšší negativní necytotoxickou koncentraci CD86) a CV70 (neboli nejvyšší povolenou koncentraci tj. 200 μg/ml). Zkouší se minimálně 4 koncentrace v každém provedení zkoušky, přičemž alespoň 2 koncentrace jsou společné s předchozím provedením (provedeními) zkoušky, a to za účelem porovnání.

15. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u zkoušky U-SENS™ používá kompletní médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v kompletním mediu) (viz odstavec 4) nebo 0,4 % DMSO v kompletním médiu (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO).

16. Pozitivní kontrolou používanou u zkoušky U-SENS™ je TNBS (viz odstavec 11) připravený v kompletním médiu. Jako pozitivní kontrola pro měření exprese CD86 se používá TNBS v jedné konečné koncentraci na destičce (50 μg/ml), což dává > 70 % životaschopnost buněk. Pro získání koncentrace TNBS na destičce 50 μg/ml se připraví 1 M (tj. 293 mg/ml) zásobního roztoku TNBS v kompletním médiu, který se dále naředí 2 930násobně s kompletním médiem na 100 μg/ml pracovního roztoku. Jako negativní kontrola se používá kyselina mléčná (LA, CAS 50-21-5) v koncentraci 200 μg/ml rozpuštěná v kompletním médiu (ze zásobního roztoku 0,4 mg/ml). Na každé destičce se při každém provedení zkoušky připraví tři replikáty neexponované kontroly v kompletním médiu, kontroly s rozpouštědlem/vehikulem, negativní kontroly a pozitivní kontroly (12). Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako u zkoušené chemické látky (odstavec 12).

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kontrola s rozpouštědlem / vehikulem nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 14–16 se smíchají 1: 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu 45±3 hodin při teplotě 37 °C za přítomnosti 5 % CO_2. Před inkubací se destičky zapečetí polopropustnou membránou, aby nedošlo k odpaření těkavých zkoušených chemických látek a křížové kontaminaci mezi buňkami exponovanými zkoušeným chemickým látkám (12).

Barvení buněk

18. Po 45 ± 3 hodinách expozice se buňky přenesou na mikrotitrační destičku s kónickým dnem a odeberou se odstředěním. Narušení rozpustnosti je definováno jako krystaly nebo kapky pozorované pod mikroskopem 45 ± 3 hodiny po expozici (před obarvením buněk). Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se jednou promyjí se 100 μl ledově studeného fosfátového pufru (PBS) obsahujícího 5 % fetálního telecího séra (barvicí pufr). Po odstředění se buňky resuspendují se 100 μl barvicího pufru a barví se 5 μl (např. 0,25 μg) protilátek anti-CD86 nebo myšího IgG1 (izotyp) značených FITC při 4 °C po dobu 30 minut chráněny před světlem. Použijí se protilátky uvedené v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12) (pro CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, nebo Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a pro IgG1: BD-PharMingen #5557 48, nebo Caltag/Invitrogen # GM4992). Podle zkušeností vývojářů zkoušek je intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Pro analýzu mohou být použity jiné klony nebo protilátky od jiných dodavatelů, které prošly kontrolou reaktivity (viz odstavec 11). Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře, a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Může být použit jiný detekční systém, např. protilátky anti-CD86 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Po dvojím promytí 100 μl barvicího pufru

a jednom promytí 100 µl ledově studeného PBS se buňky resuspendují v ledově studeném PBS (např. 125 µl pro vzorky analyzované ručně zkumavku po zkumavce nebo 50 µl s použitím automatické vzorkovací destičky) a přidá se roztok PI (konečná koncentrace 3 µg/ml). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) nebo trypanová modř, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.

Analýza pomocí průtokové cytometrie

19. Úroveň exprese CD86 a životaschopnost buněk se analyzuje pomocí průtokové cytometrie. Buňky jsou zobrazeny na dot plot histogramu vyjadřujícím velikost (FSC) a granularitu (SSC) nastaveném na logaritmickou stupnici, aby byla jasně identifikována populace v první oblasti R1 a eliminovány zbytky. Pro každou jamku se připraví cílový počet celkem 10 000 buněk v oblasti R1. Buňky ze stejné oblasti R1 se zobrazí na dot plot diagramu FL3 nebo FL4 / SSC. Životaschopné buňky se vykreslí umístěním druhé oblasti R2 selektující populaci propidiumiodid negativních buněk (kanál FL3 nebo FL4). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, lze připravit až 20 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Poté se změří procento FL1 pozitivních buněk z těchto životaschopných buněk gateovaných na R2 (v oblasti R1). Exprese CD86 na buněčném povrchu se analyzuje na dot plot histogramu FL1 / SSC gatovaném na životaschopných buňkách (R2).

U jamek s kompletním médiem / IgG1 se marker analýzy stanoví v blízkosti hlavní populace, aby měly kontroly s kompletním médiem IgG1 v cílové zóně 0,6 až 0,9 %.

Barevná interference se definuje jako posun IgG1 značeného FITC na dot plot diagramu (geometrický průměr stimulačního indexu IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulační index (S.I.) CD86 pro kontrolní buňky (neexponované nebo v 0,4 % DMSO) a buňky exponované chemické látce se vypočítá podle této rovnice:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% $IgG1^{+}$ neexponovaných kontrolních buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1 definovaných pomocí markeru analýzy (přijatelné rozmezí ≥ 0,6 % a < 1,5 %, viz odstavec 22) z životaschopných neexponovaných buněk.

% $IgG1^{+}$/$CD86^{+}$ kontrolních/exponovaných buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1/CD86 měřeno bez pohybu markeru analýzy z životaschopných kontrolních/exponovaných buněk.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

20. Ve zkoušce U-SENS™ se vypočítávají tyto parametry: hodnota CV70, tj. koncentrace vykazující 70 % přežití buněk U937 (30 % cytotoxicita) a hodnota EC150, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukovaly stimulační index (S.I.) CD86 150 %.

CV70 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

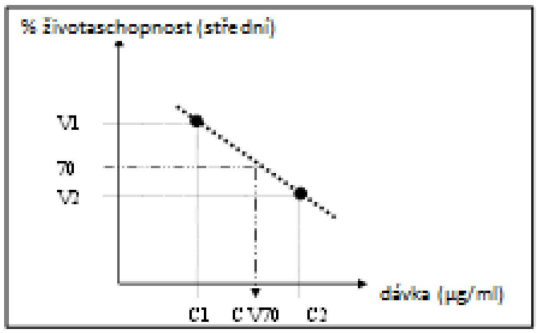
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

kde:

V1 je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 70 %

V2 je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 70 %

C1 a C2 jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk V1, respektive V2.



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV70, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

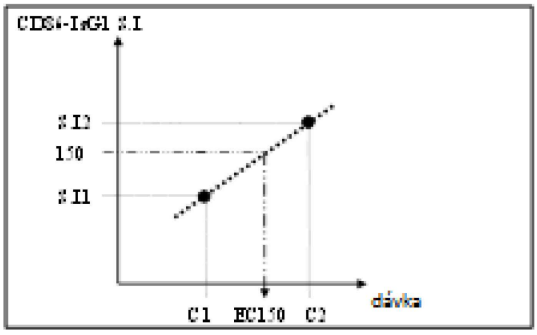
EC150 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

kde:

C1 je nejvyšší koncentrace v µg/ml se stimulačním indexem CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 je nejnižší koncentrace v µg/ml se stimulačním indexem CD86 > 150 % (S.I. 2).



Hodnoty EC150 a CV70 se vypočítají

— pro každé provedení zkoušky: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 se použijí jako nástroj pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 (viz odstavec 14),

— na základě průměrné životaschopnosti se stanoví celková hodnota CV70 (12),

— na základě průměrných hodnot stimulačního indexu CD86 se stanoví celková hodnota EC150 pro zkoušenou chemickou látku predikovanou při použití metody U-SENS™ jako POZITIVNÍ (viz odstavec 21) (12).

Predikční model

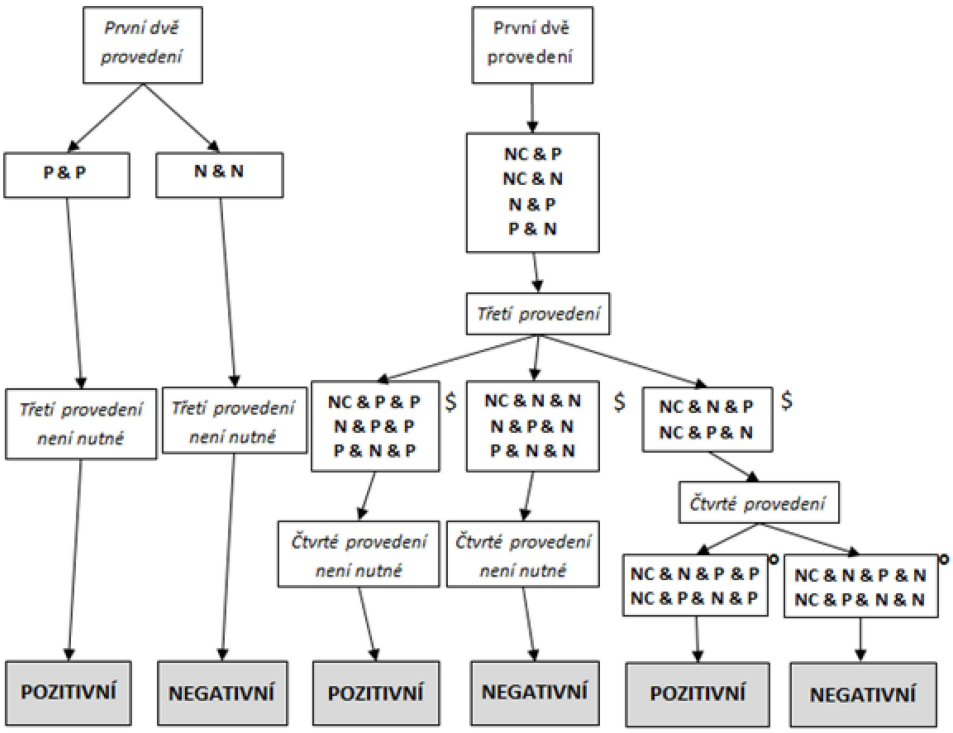
21. Pro měření exprese CD86 se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve čtyřech nezávislých provedeních zkoušky (v různé dny), z nichž se odvodí jedna předpověď (NEGATIVNÍ nebo POZITIVNÍ).

— Jednotlivé provedení zkoušky U-SENS™ se považuje za negativní (dále jen N), jestliže je stimulační index CD86 menší než 150 % při všech necytotoxických koncentracích (životaschopnost buněk ≥ 70 %) a jestliže není pozorována žádná interference (cytotoxicita, rozpustnost: viz odstavec 18 nebo barva: viz odstavec 19 bez ohledu na necytotoxické koncentrace, při nichž byla detekována interference). Ve všech ostatních případech: stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % a pozorovány interference, je jednotlivé provedení zkoušky U-SENS™ považováno za pozitivní (dále jen P).

— Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za NEGATIVNÍ, jestliže jsou negativní (N) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní (N), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za NEGATIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.

— Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za POZITIVNÍ, jestliže jsou pozitivní (P) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky pozitivní (P), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.

— Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, je zde výjimka, pokud je při prvním provedení zkoušky stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci. Toto provedení zkoušky se poté považuje za NEPRŮKAZNÉ (NC) a v dalších provedeních je třeba testovat další koncentrace (mezi nejvyšší necytotoxickou koncentrací a nejnižší cytotoxickou koncentrací – viz odstavec 20). Pokud je provedení zkoušky určeno jako NC, je třeba provést alespoň 2 další zkoušky a v případě, že druhá a třetí zkouška nesouhlasí (N a/nebo P nezávisle), provádí se čtvrtá zkouška (obrázek 1). Další zkoušky budou považovány za pozitivní i v případě, že CD86 vyjde 150 % nebo vyšší pouze u jedné necytotoxické koncentrace, neboť nastavení koncentrace bylo pro tuto konkrétní zkoušenou chemickou látku upraveno. Konečná predikce bude vycházet z většinového výsledku tří nebo čtyř jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3 nebo 2 ze 4) (obrázek 1).



Obrázek 1: Predikční model používaný při zkoušce U-SENS™. Předpověď U-SENS™ by měla být hodnocena v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavce 4 a odstavců 7, 8 a 9 Obecného úvodu.

N: Provedení zkoušky bez pozitivního výsledku CD86 a bez pozorované interference;

P: Provedení zkoušky s pozitivním výsledkem CD86 a/nebo s pozorovanou interferencí (interferencemi);

NC: Neprůkazný výsledek. První provedení s neprůkazným výsledkem, když je CD86 pozitivní pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci;

#: Neprůkazný (NC) jednotlivý výsledek zjištěný pouze při prvním provedení zkoušky vede automaticky k nutnosti třetího provedení zkoušky, aby byla dosažena většina pozitivních (P) nebo negativních (N) výsledků při alespoň 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky.

$: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše.

°: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze čtyř provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních třech provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše.

Kritéria přijatelnosti

22. Při používání zkoušky U-SENS™ by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (12).

— Na konci expozice v délce 45±3 hodin musí být střední životaschopnost trojích neexponovaných buněk U937 > 90 % a nesmí být pozorován žádný posun exprese CD86. Bazální exprese CD86 neexponovaných buněk U937 musí být v rozmezí ≥ 2 % a ≤ 25 %.

— Když je jako rozpouštědlo použit DMSO, posuzuje se platnost kontroly s vehikulem DMSO pomocí výpočtu stimulačního indexu DMSO v porovnání s neexponovanými buňkami, přičemž střední životaschopnost trojích buněk musí být > 90 %. Kontrola s vehikulem je platná, když je střední hodnota trojího stimulačního indexu CD86 menší než 250 % střední hodnoty trojího stimulačního indexu CD86 neexponovaných buněk U937.

— Provedení zkoušky se považují za platná, jestliže alespoň dvě ze tří hodnot IgG1 neexponovaných buněk U937 spadají do rozmezí ≥ 0,6 % a < 1,5 %.

— Souběžně prováděná negativní kontrola (kyselina mléčná) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly negativní (CD86 S.I. < 150 %) a necytotoxické (životaschopnost buněk ≥ 70 %).

— Pozitivní kontrola (TNBS) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly pozitivní (CD86 S.I. ≥150 %) a necytotoxické (životaschopnost buněk ≥ 70 %).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

23. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, úplná rozpustnost v médiu, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost v kompletním médiu, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie;,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

— použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

— životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu CD86 získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

Zkušební postup

— počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),

— doba expozice,

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— údaje ve formě tabulky, včetně CV70 (v relevantních případech), stimulačního indexu, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu,

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných za pomoci zkoušky U-SENS™,

— diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL-ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Dostupné na: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL-ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Dostupné na: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Chem. Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostupné na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupné na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Dostupné na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatek 2.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (14).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (15).

Odpověď na koncentraci CD86: k závislosti na koncentraci (neboli odpovědi na koncentraci) dochází, když po pozitivní koncentraci (CD86 S.I. ≥ 150) následuje koncentrace se zvyšujícím se stimulačním indexem CD86.

Chemická látka: látka nebo směs.

CV70: odhad koncentrace ukazující 70 % životaschopnost buněk.

Posun: posun je definován tak, že i) korigovaná hodnota % $CD86^+$ neexponovaného kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % $CD86^+$ neexponovaných kontrolních replikátů 1 a 2 a ii) korigovaná hodnota % $CD86^+$ negativního kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % $CD86^+$ negativních kontrolních replikátů 1 a 2.

EC150: odhad koncentrací vykazujících 150 % stimulační index exprese CD86.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozměněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací, např. oxidací, staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

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) zkoušky (14).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (14).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických 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 (14).

S.I.: stimulační index. Relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s buňkami exponovanými rozpouštědlu.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (14).

Barvicí pufr: fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku obsahující 5 % fetálního telecího séra.

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkouškou.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (16).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (14).

Dodatek 2.2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi U-SENS™ u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV70 a EC150, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané zkouškou U-SENS™. Pro zkoušku U-SENS™ jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (1) (8).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění zkoušky U-SENS™

Látky pro prokázání způsobilosti	**Fyzikální forma**	**Skupenství**	**Předpověď *in vivo*** [1]	**U-SENS Rozpouštědlo/ vehikulum**	**U-SENS CV70 Odkaz Rozsah v µg/ml** [2]	**U-SENS (referenční rozmezí EC150 v µg/ml)** [2]
benzen-1,4-diamin	106-50-3 Org.	pevná látka	senzibilizující (silně)	kompletní médium [3]	< 30	pozitivní (≤ 10)
kyselina picrylsulfonová	2508-19-2	kapalina	senzibilizující (silně)	kompletní médium	> 50	pozitivní (≤ 50)
diethyl-maleinát	141-05-9	kapalina	senzibilizující (středně silně)	DMSO	10–100	pozitivní (≤ 20)
resorcin	108-46-3	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	kompletní médium	> 100	pozitivní (≤ 50)
skořicový alkohol	104-54-1	pevná látka	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (10–100)
estragol	140-67-0	kapalina	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (< 200)
sacharin	81-07-2	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina salicylová	69-72-7	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (1) (8). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (17).

(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (8).

(3) Kompletní médium: Médium RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (8).

Dodatek 3

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ANALÝZA IL-8 LUC

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Na rozdíl od zkoušek analyzujících expresi buněčných povrchových markerů kvantifikuje analýza L8-Luc změny v expresi IL-8, cytokinu spojeného s aktivací dendritických buněk (DC). V reportérové buněčné linii IL-8 odvozené od THP (THP-G8, vytvořené z buněčné linie lidské akutní monocytární leukémie THP-1) se měří exprese IL-8 po expozici senzibilizujícím látkám (1). Poté se použije exprese luciferázy jako pomůcka pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži.

2. Analýza IL-8 Luc byla hodnocena ve validační studii (2) provedené Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM), **ministerstvem hospodářství, obchodu a průmyslu** (METI) a Japonskou společností **pro alternativy experimentů na zvířatech (JSAAE**) a poté byla podrobena nezávislému hodnocení (3) pod záštitou střediska JaCVAM a ministerstva zdravotnictví, práce a sociálních věcí (MHLW) s podporou útvaru pro **Mezinárodní spolupráci při alternativních zkušebních** metodách (ICATM). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků je analýza IL-8 Luc považována za užitečnou v rámci přístupu IATA na rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů z analýzy IL-8 Luc v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4) (5) (6).

3. U analýzy IL-8 Luc se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s používáním buněčných kultur a měřením luciferázy. Reprodukovatelnost v rámci laboratoře a mezilaboratorní reprodukovatelnost činily 87,7 %, respektive 87,5 % (2). Údaje získané z validační studie (2) a dalších zveřejněných prací (1) (6) ukazují, že analýza IL-8 Luc určila 118 ze 143 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 25 jako neprůkazných a že přesnost analýzy IL-8 Luc při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP) činí 86 % (101/118) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 41 % (9/22). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti, jak je popsáno níže (odstavec 5), analýza IL-8 Luc určila 113 ze 136 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 23 jako neprůkazných, přičemž přesnost analýzy IL-8 Luc činí 89 % (101/113) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 53 % (9/17). Podle údajů o použití u lidí citovaných v Urbisch et al. (7) analýza IL-8 Luc určila 76 z 90 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 14 jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 80 % (61/76), citlivosti 93 % (54/58) a specifičnost 39 % (7/18). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti analýza IL-8 Luc určila 71 z 84 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 13 chemických látek jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 86 % (61/71) při citlivosti 93 % (54/58) a specifičnosti 54 % (7/13). Falešně negativní předpovědi se u analýzy IL-8 Luc pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou/střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci (podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (6). Celkově vzato tyto informace podporují roli, kterou může analýza IL-8 Luc sehrát při identifikaci nebezpečí senzibilizace kůže. Uvedená přesnost analýzy IL-8 Luc jako samostatné zkoušky je však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení zkoušek na senzibilizaci kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že analýzu IL-8 Luc lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (2) (6).

5. Ačkoli analýza IL-8 Luc používá jako rozpouštědlo X-VIVO™ 15, správně vyhodnotila chemické látky s log K_{ow} >3,5 a chemické látky s rozpustností ve vodě 100 μg/ml podle výpočtu pomocí EPI Suite™ a její schopnost detekovat senzibilizující látky špatně rozpustné ve vodě je lepší než v případě analýzy IL-8 Luc používající jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) (2). Negativní výsledky u zkoušených chemických látek, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml, však mohou dávat falešně negativní výsledky vzhledem k jejich nerozpustnosti v X-VIVO™ 15. Negativní výsledky u těchto zkoušených chemických látek by proto neměly být brány v úvahu. Ve validační studii byla pozorována vysoká míra falešně negativních výsledků u anhydridů. Dále z důvodu omezené metabolické schopnosti buněčné linie (8) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (látky vyžadující metabolickou aktivaci) a prehapteny (látky aktivované oxidací) při analýze vykazovat negativní výsledky. Ačkoliv by však měly být negativní výsledky u pravděpodobných pre/prohaptenů interpretovány opatrně, analýza IL-8 Luc správně posoudila 11 z 11 prehaptenů, 6/6 prohaptenů a 6/8 pre/prohaptenů v souboru dat analýzy IL-8 Luc (2). Na základě nedávno provedené komplexní revize tří zkoušek neprováděných na zvířatech (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekci pre- a prohaptenů (9) a na základě skutečnosti, že buňky THP-G8 používané při analýze IL-8 Luc jsou buněčná linie derivovaná z buněk THP-1, které se používají při zkoušce h-CLAT, může analýza IL-8 Luc také přispět ke zvýšení citlivosti zkoušek prováděných na zvířatech, které jsou určeny na detekci pre- a prohaptenů, v kombinaci s jinými zkouškami. Zkoušené povrchově aktivní látky zatím dávaly (falešně) pozitivní výsledky bez ohledu na jejich druh (např. kationtové, aniontové nebo neiontové). Konečně, zkoušené chemické látky, jež ovlivňují luciferázu, mohou zkreslit její aktivitu/měření, neboť způsobují zjevnou inhibici nebo zvýšenou luminiscenci (10). Uvádí se například, že koncentrace fytoestrogenu vyšší než 1 μM ovlivnila luminiscenční signály v jiných zkouškách reporterových genů založených na luciferáze v důsledku nadměrné aktivace reporterového genu luciferázy. V důsledku toho je nutné pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají aktivaci reporterového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (11). Na základě výše uvedeného jsou povrchově aktivní látky, anhydridy a chemické látky interferující s luciferázou mimo oblast použitelnosti této analýzy. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost analýzy IL-8 Luc na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato zkouška u těchto specifických kategorií používat.

6. Jak bylo popsáno výše, pomáhá analýza IL-8 Luc rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Ke stanovení toho, zda mohou výsledky analýzy IL-8 Luc přispět k hodnocení potence při posuzování v kombinaci s jinými zdroji informací, však bude zapotřebí další výzkum, nejlépe založený na údajích o účincích na člověka.

7. Definice jsou uvedeny v dodatku 3.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Analýza IL-8 Luc využívá buněčnou linii THP-1 lidské monocytární leukemie, která byla získána z Americké sbírky typových kultur (Manassas, VA, USA). S využitím této buněčné linie vytvořila Katedra dermatologie Lékařské fakulty Univerzity v Tohoku reportérovou buněčnou linii IL-8 derivovanou z buněk THP-1, THP-G8, která obsahuje geny stabilní luciferázové oranže (SLO) a stabilní luciferázové červeně (SLR) pod kontrolou promotérů IL-8, respektive glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) (1). To umožňuje kvantitativní měření indukce genu luciferázy pomocí lumuniscenční detekce za použití známých substrátů pro luciferázu produkujících světlo jako ukazatele aktivity transkripčního faktoru IL-8 a GAPDH v buňkách po expozici senzibilizujícím látkám.

9. Duální barevný zkušební systém sestává z luciferázy emitující oranžovou (SLO; λmax = 580 nm) (12) pro genovou expresi promotéru IL-8 a z luciferázy emitující červenou (SLR; λmax = 630 nm) (13) pro genovou expresi interního kontrolního promotéru, GAPDH. Tyto dvě luciferázy emitují po reakci s d-luciferinem světlušek různé barvy, přičemž jejich luminiscence se měří současně v jednostupňové reakci rozdělením emise z analyzované směsi pomocí optického filtru (14) (dodatek 3.2).

10. Buňky THP-G8 se po dobu 16 hodin exponují zkoušené chemické látce a poté se změří aktivita luciferázy SLO (SLO-LA), která vyjadřuje aktivitu promotéru IL-8 a aktivitu luciferázy SLR (SLR-LA), vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH. Aby byly zkratky snadno pochopitelné, označují se SLO-LA a SLR-LA jako IL8LA, respektive GAPLA. V tabulce 1 je uveden popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc. Naměřené hodnoty se používají pro výpočet normalizované hodnoty IL8LA (nIL8LA), což je poměr IL8LA ke GAPLA; indukce nIL8LA (Ind-IL8LA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látce a hodnot nIL8LA neexponovaných buněk THP-G8; a inhibice GAPLA (Inh-GAPLA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot GAPLA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látce a hodnot GAPLA neexponovaných buněk THP-G8, a použijí se jako ukazatel cytotoxicity.

Tabulka 1

Popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc

Zkratky	Definice
GAPLA	Aktivita luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH
IL8LA	Aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / nIL8LA neexponovaných buněk
Inh-GAPLA	GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / GAPLA neexponovaných buněk
CV05	Nejnižší koncentrace chemické látky, při níž je Inh-GAPLA < 0,05.

11. Jsou k dispozici technické parametry (PS) (15), které usnadní validaci pozměněných zkoušek luciferázy IL-8 *in vitro* obdobných analýze IL-8 Luc a umožní včas provést změnu pokynu OECD 442E, aby do ní mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD (MAD) bude zaručeno pouze u zkoušek validovaných podle těchto technických parametrů, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do pokynu ke zkoušení 442E (16).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 3.3, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (17). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 15) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 21–24) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

13. Jsou k dispozici standardní pracovní postupy pro analýzu IL-8 Luc a měly by být používány pro provádění této zkoušky (18). Laboratoře, jež chtějí tuto zkoušku provádět, mohou získat rekombinantní buněčnou linii výkonnostních standardů od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko po uzavření smlouvy o prodeji materiálu (MTA)

v souladu s podmínkami uvedenými ve vzoru OECD. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů analýzy.

Příprava buněk

14. Při provádění analýzy IL-8 Luc by se měla používat buněčná linie THP-G8 od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (viz odstavce 8 a 13). Buňky se po obdržení pomnoží (2–4 pasáže) a skladují se zmrazené jako homogenní kmen. Buňky z této zásoby mohou být pasážovány maximálně 12krát nebo maximálně 6 týdnů. K množení se používá kultivační médium RPMI-1640 obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS), antibiotický/antimykotický roztok (100 jednotek/ml penicilinu G, 100 µg/ml streptomycinu a 0,25 µg/ml amfotericinu B v 0,85 % fyziologickém roztoku) (např. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycinu (např. CAS:58-58-2) a 300 µg/ml G418 (např. CAS:108321-42-2).

15. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Tato kontrola se provádí 1–2 týdny nebo 2–4 pasáže po rozmrazení za použití pozitivní kontroly, 4-nitrobenzyl-bromidu (4-NBB) (CAS:100-11-8, čistota ≥ 99 %) a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS:50-21-5, čistota ≥ 85 %). 4-NBB by měl dát pozitivní odpověď na Ind-IL8LA (≥ 1,4), zatímco kyselina mléčná by měla dát negativní odpověď na Ind-IL8LA (< 1,4). Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Kontrola se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 22–24.

16. Pro zkoušení se buňky THP-G8 nasadí v hustotě 2 až 5 × 10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 48 až 96 hodin. V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky promyjí RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik a poté resuspendují s RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik při 1 × 10^6 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem (např. Costar kat. č. 3603) s 50 µl (5 × 10^4 buněk/jamka).

Příprava zkoušené chemické látky a kontrolních látek

17. Zkoušená chemická látka a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro analýzu IL-8 Luc se zkoušené chemické látky rozpustí v X-VIVO™ 15, komerčně dostupném médiu bez séra (Lonza, 04-418Q), na konečnou koncentraci 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se přidá do 20 mg zkoušené chemické látky (bez ohledu na rozpustnost chemické látky) ve zkumavce do mikroodstředivky a doplní se na objem 1 ml a poté se silně odstředí a promíchává na rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu 30 minut při okolní teplotě přibližně 20 °C. Pokud jsou pevné chemické látky stále nerozpustné, zkumavka se poté vloží do ultrazvukové lázně, dokud se chemická látka zcela nerozpustí nebo dokud není stabilně dispergována. U zkoušených chemických látek, které jsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se roztok naředí přípravkem X-VIVO™ 15 faktorem 5 a použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky (4 mg/ml). U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se směs opět promíchává po dobu alespoň 30 minut, poté se odstředí při 15000 ot/min (≈ 20000 *g*) po dobu 5 minut; výsledný supernatant se použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky. Pro použití jiných rozpouštědel, jako je DMSO, voda nebo kultivační médium, je třeba uvést vědecké zdůvodnění. Podrobný postup rozpuštění chemických látek je uveden v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 popsané v odstavcích 18–23 se smíchají 1: 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 16).

18. Cílem prvního provedení zkoušky je stanovit cytotoxickou koncentraci a zkoumat potenciál chemických látek senzibilizovat kůži. Pomocí X-VIVO™ 15 se připraví sériově naředěné zásobní roztoky X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek při faktoru ředění dva (viz dodatek 3.5) s použitím 96jamkového zkušebního bloku (např. Costar kat. č. EW-01729-03). Poté se 50 µl/jamku naředěného roztoku přidá do 50 µl buněčné suspenze v 96jamkové černé destičce s plochým dnem. Pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpustné v X-VIVO ™ 15, bude tedy konečná koncentrace zkoušených chemický látek v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatek 3.5). Pro zkoušené chemické látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO ™ 15 při 20 mg/ml, se stanoví pouze faktory ředění v rozsahu od 2 do 2^{10}, přestože jsou skutečné konečné koncentrace zkoušených chemických látek nejisté a závisí na saturované koncentraci zkoušených chemických látek v zásobním roztoku X-VIVO ™ 15.

19. Při dalších provedeních zkoušky (tj. druhý, třetí a čtvrtý replikát) se zásobní roztoky X-VIVO™ 15 připraví při koncentraci čtyřikrát vyšší, než je koncentrace životaschopnosti buněk 05 (CV05; nejnižší koncentrace, při níž je Inh-GAPLA < 0,05) v prvním experimentu. Jestliže Inh-GAPLA neklesne při prvním provedení zkoušky pod 0,05 při nejvyšší koncentraci, zásobní roztok X-VIVO™ 15 se připraví v nejvyšší koncentraci při prvním provedení zkoušky. Koncentrace CV05 se vypočítá vydělením koncentrace zásobního roztoku v prvním provedení zkoušky faktorem ředění pro CV05 (X) (faktor ředění CV05 (X); faktor ředění potřebný pro naředění zásobního roztoku na CV05) (viz dodatek 3.5). Pro zkoušené látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO při 20 mg/ml, se CV05 určí podle koncentrace zásobního roztoku × 1/X. Pro provedení zkoušky 2 až 4 se připraví druhý zásobní roztok jako 4 × CV05 (dodatek 3.5).

20. Připraví se sériově naředěné druhé zásobní roztoky X-VIVO™ 15 při faktoru ředění 1,5 s použitím 96jamkového zkušebního bloku. Poté se 50 µl/jamku naředěného roztoku přidá do 50 µl buněčné suspenze v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace každé zkoušené chemické látky by měla být testována ve 4 jamkách. Vzorky se poté míchají na třepačce a inkubují po dobu 16 hodin při 37°C a 5 % CO_2 a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno níže.

21. Kontrola s rozpouštědlem je směs 50 µl/jamku X-VIVO™ 15 a 50 µl/jamku buněčné suspenze v RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS.

22. Doporučená pozitivní kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se připraví ve zkumavce do mikroodstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml. Zkumavka se silně odstředí a promíchává na rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu alespoň 30 minut. Po odstředění při 20000 g po dobu 5 minut se supernatant naředí faktorem 4 přípravkem X-VIVO™ 15 a 500 µl naředěného supernatantu se přenese do jamky 96jamkového zkušebního bloku. Naředěný supernatant se dále naředí přípravkem přípravkem X-VIVO™ 15 při faktoru 2 a 4 a 50 µl roztoku se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem (dodatek 3.6). Každá koncentrace pozitivní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO_2 po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO_2) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.

23. Doporučená negativní kontrola je kyselina mléčná. 20 mg kyseliny mléčné se připraví ve zkumavce do mikroodstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku kyseliny mléčné se naředí faktorem 5 přípravkem X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohoto roztoku kyseliny mléčné 4 mg/ml se přenese do jamky 96jamkového zkušebního bloku. Tento roztok se naředí faktorem 2 přípravkem X-VIVO™ 15 a poté se opět naředí faktorem 2, aby vznikly roztoky 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl těchto 3 roztoků a kontroly s vehikulem (X-VIVO™ 15) se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace negativní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO_2 po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO_2) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.

24. Lze použít i jiné vhodné pozitivní nebo negativní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky.

25. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí.

26. Zkoušené chemické látky a kontrola s rozpouštědlem vyžadují 2 až 4 provedení zkoušky, aby mohla být stanovena pozitivní nebo negativní predikce (viz tabulka 2). Každé opakování se provádí v různý den s čerstvým zásobním roztokem X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek a s nezávisle sklizenými buňkami. Buňky mohou pocházet ze stejné pasáže.

Měření aktivity luciferázy

27. Luminiscence se měří pomocí luminometru na 96jamkové destičky vybaveného optickými filtry, např. Phelios (ATTO, Tokyo, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Německo) a ARVO series (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometr musí být kalibrován pro každou zkoušku, aby byla zajištěna reprodukovatelnost (19). Pro tuto kalibraci se dodávají rekombinantní luciferázy emitující oranžovou a červenou.

28. Do každé jamky destičky obsahující buněčnou suspenzi exponovanou nebo neexponovanou chemické látce se přenese 100 µl ohřáté reagencie Tripluc® Luciferase (Tripluc). Destička se protřepává po dobu 10 minut při okolní teplotě přibližně 20°C. Destička se umístí do luminometru a změří se aktivita luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu 3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1). Při použití alternativního uspořádání, např. v závislosti na modelu použitého luminometru, je třeba uvést zdůvodnění.

29. Z naměřených hodnot se vypočítají parametry pro každou koncentraci, např. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, střední hodnota ±SD IL8LA, střední hodnota ±SD GAPLA, střední hodnota ±SD nIL8LA, střední hodnota ±SD Ind-IL8LA, střední hodnota ±SD Inh-GAPLA a 95 % konfidenční interval Ind-IL8LA. Definice parametrů použitých v tomto odstavci jsou uvedeny v dodatcích 3.1 a 3.4.

30. Před měřením se zajistí barevné rozlišení u vícebarevných reportérových analýz obvykle pomocí detektorů (luminometr a čtečka destiček) vybavených optickými filtry, jako jsou např. sharp-cut (dlouhovlnné nebo krátkovlnné průchodové) filtry nebo pásmové průchodové filtry. Před zkouškou je třeba kalibrovat prostupové koeficienty filtru pro každou barvu bioluminiscenčního signálu podle dodatku 3.2.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

31. Kritéria pro pozitivní/negativní rozhodnutí vyžadují, aby při každém provedení zkoušky:

— byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako pozitivní, jestliže má zkoušená chemická látka Ind-IL8LA ≥ 1,4 a dolní limit 95 % konfidenčního intervalu Ind-IL8LA ≥ 1,0,

— byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako negativní, jestliže má zkoušená chemická látka Ind-IL8LA < 1,4 a/nebo dolní limit 95 % konfidenčního intervalu Ind-IL8LA < 1,0.

Predikční model

32. Zkoušené chemické látky, které dávají dva pozitivní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pozitivní, zatímco zkoušené chemické látky, které dávají tři negativní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pravděpodobně negativní (tabulka 2). Z pravděpodobně negativních chemických látek jsou chemické látky, které se rozpouštějí při 20 mg/ml X-VIVO™ 15, určeny jako negativní, zatímco chemické látky, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml X-VIVO™ 15, by neměly být brány v úvahu (obrázek 1).

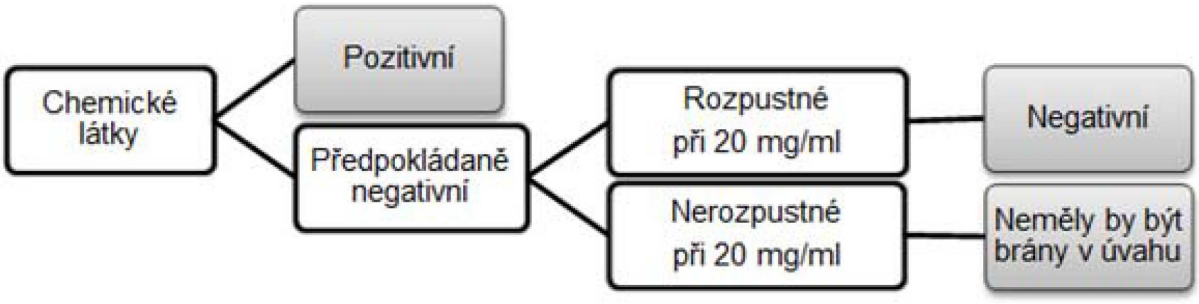
Tabulka 2

Kritéria pro identifikaci pozitivních a pravděpodobně negativních látek

1. provedení	2. provedení	3. provedení	4. provedení	Konečná predikce
pozitivní	pozitivní	–	–	pozitivní
	negativní	pozitivní	–	pozitivní
		negativní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
negativní	pozitivní	pozitivní	–	pozitivní
		negativní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
	negativní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
		negativní	–	pravděpodobně negativní

Obrázek 1

Predikční model pro konečné posouzení



Kritéria přijatelnosti

33. Při použití zkoušky IL-8 Luc by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti:

— Ind-IL8LA by mělo být větší než 5,0 alespoň v jedné koncentraci pozitivní kontroly, 4-NBB, při každém provedení zkoušky.

— Ind-IL8LA by mělo být menší než 1,4 při jakékoli koncentraci negativní kontroly, kyselina mléčná, při každém provedení zkoušky.

— Údaje z destiček, kde je GAPLA kontrolních jamek s buňkami a přípravkem Tripluc, ale bez chemických látek menší než pětinásobek této hodnoty jamek obsahujících pouze zkoušené médium (50 µl/jamku RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS a 50 µl/jamku X-VIVO™ 15), se vyřadí.

— Údaje z destiček, kde je Inh-GAPLA všech koncentrací zkoušené chemické látky nebo kontrolních chemických látek menší než 0,05, se vyřadí. V takovém případě by měla být první zkouška zopakována, tak aby byla nejvyšší konečná koncentrace opakované zkoušky stejná jako nejnižší konečná koncentrace předchozí zkoušky.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

34. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— rozpustnost v X-VIVO™ 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO™ 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO™ 15.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— rozpustnost v X-VIVO™ 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO™ 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO™ 15.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— případně fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti.

Negativní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiných negativních kontrol, než které jsou uvedeny v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použitá buněčná linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byla získána),

— číslo šarže a původ FBS, jméno dodavatele, číslo šarže 96jamkové černé destičky s plochým dnem a číslo šarže reagencie Tripluc,

— číslo pasáže a hustota buněk použitých ke zkoušení,

— metoda počítání buněk použitá při jejich nasazování před zkoušením a opatření přijatá k zajištění homogenní distribuce počtu buněk,

— použitý luminometr (např. model), včetně nastavení přístroje, použitý substrát pro luciferázu a prokázání přiměřeného měření luminiscence na základě kontrolního testu, který je popsán v dodatku 3.2,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky (např. zkoušením vhodných látek) nebo pro prokázání reprodukovatelného provedení této zkoušky v průběhu doby.

Zkušební postup

— počet replikátů a počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, postup aplikace a doba expozice (pokud se liší od doporučených),

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis použitých kritérií přijatelnosti studie,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— měření IL8LA a GAPLA,

— výpočty pro nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,

— 95 % konfidenční interval Ind-IL8LA,

— graf zobrazující křivky dávka-odpověď pro indukci aktivity luciferázy a životaschopnost,

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných za pomoci analýzy IL-8 Luc,

— diskuse o výsledcích analýzy v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěr

LITERATURA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). Bude vydáno - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné: na webových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatek 3.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (16).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (20).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV05: životaschopnost buněk 05, tj. minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Ind-IL8LA. Viz Ind-IL8LA, kde je uvedena definice.

GAPLA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové červeně (SLR) (λmax = 630 nm), regulované promotérem GAPDH, která prokazuje životaschopnost buněk a počet životaschopných buněk.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

II-SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Inh-GAPLA. Viz Inh-GAPLA, kde je uvedena definice.

IL-8 (Interleukin-8): cytokin derivovaný z endotelových buněk, fibroblastů, keratinocytů, makrofágů a monocytů, který vyvolává chemotaxi neutrofilů a T-lymfocytů.

IL8LA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové oranžové (SLO) (λmax = 580 nm), regulované promotérem IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukce nIL8LA. Stanoví se vydělením nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám touto hodnotou nestimulovaných buněk THP-G8 a představuje indukci aktivity promotéru IL-8 chemickými látkami.

Inh-GAPLA: inhibice GAPLA. Stanoví se vydělením GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám touto hodnotou neexponovaných buněk THP-G8 a představuje cytotoxicitu chemických látek.

Minimální prahová hodnota indukce (MIT): nejnižší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna z hlavních složek v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8 (IL8LA) normalizovaná aktivitou luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH (GAPLA). Představuje aktivitu promotéru IL-8 po zohlednění životaschopnosti buněk nebo počtu buněk.

nSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení nIL8LA. Viz nIL8LA, kde je uvedena definice.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

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) zkoušky (16).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (16).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

SLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení IL8LA. Viz IL8LA, kde je uvedena definice.

SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení GAPLA. Viz GAPLA, kde je uvedena definice.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: nazývané též povrchově aktivní látka je látka jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako sufraktant. (TG437)

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

THP-G8: reportérova buněčná linie IL-8, která se používá při analýze IL-8 Luc. Lidská buněčná linie THP-1 podobná makrofágům byla transfekována geny luciferázy SLO a SLR pod kontrolou promotéru IL-8, respektive GAPDH.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (21).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 3.2

PRINCIP MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENÍ PROSTUPOVÝCH KOEFICIENTŮ OPTICKÉHO FILTRU PRO SLO A SLR

Multireportérový analytický systém Tripluc se může používat s luminometrem na mikrodestičky s vícebarevným detekčním systémem, který může zahrnovat optický filtr (např. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optický filtr použitý při měření je dlouhovlnný nebo krátkovlnný průchodový filtr 600–620 nm nebo pásmový průchodový filtr 600–700 nm.

MĚŘENÍ DVOUBAREVNÝCH LUCIFERÁZ S OPTICKÝM FILTREM.

V tomto příkladu se používá přístroj Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometr je vybaven dlouhovlnným průchodovým filtrem 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtr 1) pro rozdělení luminiscence SLO (λmax = 580 nm) a SLR (λmax = 630 nm).

Pro stanovení prostupových koeficientů filtru 600 nm LP se nejprve pomocí purifikovaných enzymů luciferázy SLO a SLR změří i) SLO a intenzita bioluminiscence SLR bez filtru (F0), ii) intenzita bioluminiscence SLO a SLR, která prošla přes filtr 600 nm LP (filtr 1), a iii) vypočítají se prostupové koeficienty filtru 600 nm LP pro SLO a SLR uvedené níže.

Prostupové koeficienty		Zkratka	Definice
SLO	filtr 1 prostupové koeficienty	κO_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLO
SLR	filtr 1 prostupové koeficienty	κR_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLR

Když je ve zkušebním vzorku definována intenzita SLO a SLR jako O, respektive R, i) je intenzita světla bez filtru (celooptický) F0 a ii) intenzita světla, které prochází přes filtr 600 nm LP (filtr 1) F1 popsána, jak je uvedeno níže.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Tyto vzorce lze vyjádřit takto:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Poté můžete pomocí vypočtených činitelů prostupnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a změřených hodnot F0 a F1 vypočítat hodnoty O a R takto:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiál a metody pro stanovení činitele prostupnosti

1) *Reagencie*

Jednotlivé purifikované luciferázové enzymy:

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLO

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLR

(které byly pro validaci získány od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s buněčnou linií THP-G8)

Zkušební reagencie:

zkušební reagencie Tripluc® Luciferase (např. od společnosti TOYOBO kat. č. MRA-301)

Médium: pro analýzu luciferázy (30 ml, uchováváno při 2–8°C)

reagencie	konc.	konečná konc. v médiu	potřebné množství
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2) *Příprava enzymatického roztoku*

Lyofilizovaný purifikovaný enzym luciferázy rozpusťte ve zkumavce s 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl nebo Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) a doplňte 10 % (objemové hmotnosti) glycerolu, enzymatický roztok rozdělte po 10 µl do jednorázových zkumavek o objemu 1,5 ml a uložte je do mrazničky při –80°C. Zmrazený enzymatický roztok můžete používat po dobu 6 měsíců. Při použití přidejte do každé zkumavky obsahující enzymatický roztok (naředěný enzymatický roztok) 1 ml média pro analýzu luciferázy (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uložte je na led, abyste zabránili deaktivaci.

3) *Měření bioluminiscence*

Rozmrazte zkušební reagencii Tripluc® Luciferase (Tripluc) a nechte ji při pokojové teplotě ve vodní lázni nebo při teplotě okolního vzduchu. Luminometr zapněte 30 minut před zahájením měření, aby se stabilizoval fotonásobič. Přeneste 100 µl naředěného enzymatického roztoku do černé 96jamkové destičky (s plochým dnem) (referenční vzorek SLO do jamek B1, B2, B3, referenční vzorek SLR do jamek D1, D2, D3). Poté napipetujte 100 µl předem ohřátého přípravku Tripluc do každé jamky destičky obsahující naředěný enzymatický vzorek. Pomocí třepačky protřepávejte destičku po dobu 10 minut při pokojové teplotě (přibližně 25°C). Pokud se v roztoku v jamkách objeví bublinky, odstraňte je. Destičku vložte do luminometru a změřte aktivitu luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu
3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1).

Prostupové koeficienty optického filtru byly vypočteny takto:

Prostupový koeficient (SLO (κO_{R60})) = (#B1 z F1+ #B2 z F1+ #B3 z F1) / (#B1 z F0+ #B2 z F0+ #B3 z F0)

Prostupový koeficient (SLR (κR_{R60})) = (#D1 z F1+ #D2 z F1+ #D3 z F1) / (#D1 z F0+ #D2 z F0+ #D3 z F0)

Vypočítané prostupové faktory se použijí pro všechna měření prováděná pomocí stejného luminometru.

KONTROLA KVALITY VYBAVENÍ

Použijí se postupy uvedené v protokolu k analýze IL-8 Luc (18).

Dodatek 3.3

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost získáním předpokládané předpovědi analýzy IL-8 Luc u 9 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 9 vhodných látek (zvolených tak, aby zastupovaly celý rozsah odpovědí pro rizika senzibilizace kůže). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané analýzou IL-8 Luc. Pro analýzu IL-8 Luc jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (6) (1).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění analýzy IL-8 Luc

Látky pro prokázání způsobilosti	č. CAS	Skupenství	Rozpustnost v X-VIVO15 při 20 mg/ml	Předpověď *in vivo* (1)	Predikce podle IL-8 Luc (2)	Referenční rozpětí (μg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (extrémně)	pozitivní	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehyd	50-00-0	kapalina	rozpustná	senzibilizující (silně)	pozitivní	9–30	4–9
2-sulfanylbenzothiazol	149-30-4	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	250–290	60–250
ethylendiamin	107-15-3	kapalina	rozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	500–700	0,1–0,4
ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,04–0,1
4-allylanizol (estragol)	140-67-0	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,01–0,07
streptomycin sulfát	3810-74-0	pevná látka	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
glycerol	56-81-5	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
Propan-2-ol	67-63-0	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000

Zkratky: Číslo CAS = registrační číslo Chemical Abstracts Service
(1) Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (19).
(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (6).
(3) CV_{05} a IL-8 Luc MIT byly vypočteny pomocí rozpustnosti ve vodě uvedené v EPI Suite™.
(4) CV_{05}: minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.
(5) MIT: nejnižší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

Dodatek 3.4

INDEXY A KRITÉRIA POSUZOVÁNÍ

nIL8LA (nSLO-LA)

Pro IL8LA (SLO-LA), respektive GAPLA (SLR-LA) se měří j-té opakování (j = 1–4) i-té koncentrace (i = 0–11). Normalizovaná IL8LA, označovaná nIL8LA (nSLO-LA), je definována jako:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Je to základní jednotka měření v této analýze.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Násobné zvýšení zprůměrované nIL8LA (nSLO-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s touto hodnotou při koncentraci 0, Ind-IL8LA je primárním měřítkem této analýzy. Tento poměr se zapisuje pomocí následující rovnice:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Vedoucí laboratoř navrhla, aby pozitivnímu výsledku pro zkoušenou chemickou látku odpovídala hodnota 1,4. Tato hodnota vychází ze studia dosavadních údajů vedoucí laboratoře. Tým pro správu dat poté používal tuto hodnotu ve všech fázích validační studie. Primární výsledek, Ind-IL8LA, je podíl dvou aritmetických průměrů, jak ukazuje rovnice.

95 % KONFIDENČNÍ INTERVAL (95 % CI)

Může být odhadnut 95 % konfidenční interval (95 % CI) na základě podílu, který ukazuje přesnost tohoto primárního výsledného měřítka. Dolní limit 95 % CI ≥ 1 ukazuje, že nIL8LA v i-té koncentraci je významně větší než tato hodnota při kontrole s rozpouštědlem. 95 % CI lze sestavit několika způsoby. V této studii jsme použili metodu známou jako Fiellerův teorém. Tento teorém 95 % konfidenčního intervalu se získá z následujícího vzorce:

$$[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}],$$

kde .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

je 97,5 percentil centrálního t rozdělení s ν stupněmi volnosti, kde

$$\nu = (\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/\{(\frac{sd_0^2}{n_0})^2/(n_0 - 1) + (\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/(n_{yi} - 1)\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je poměr zprůměrované GAPLA (SLR-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s koncentrací u kontroly s rozpouštědlem a zapisuje se jako

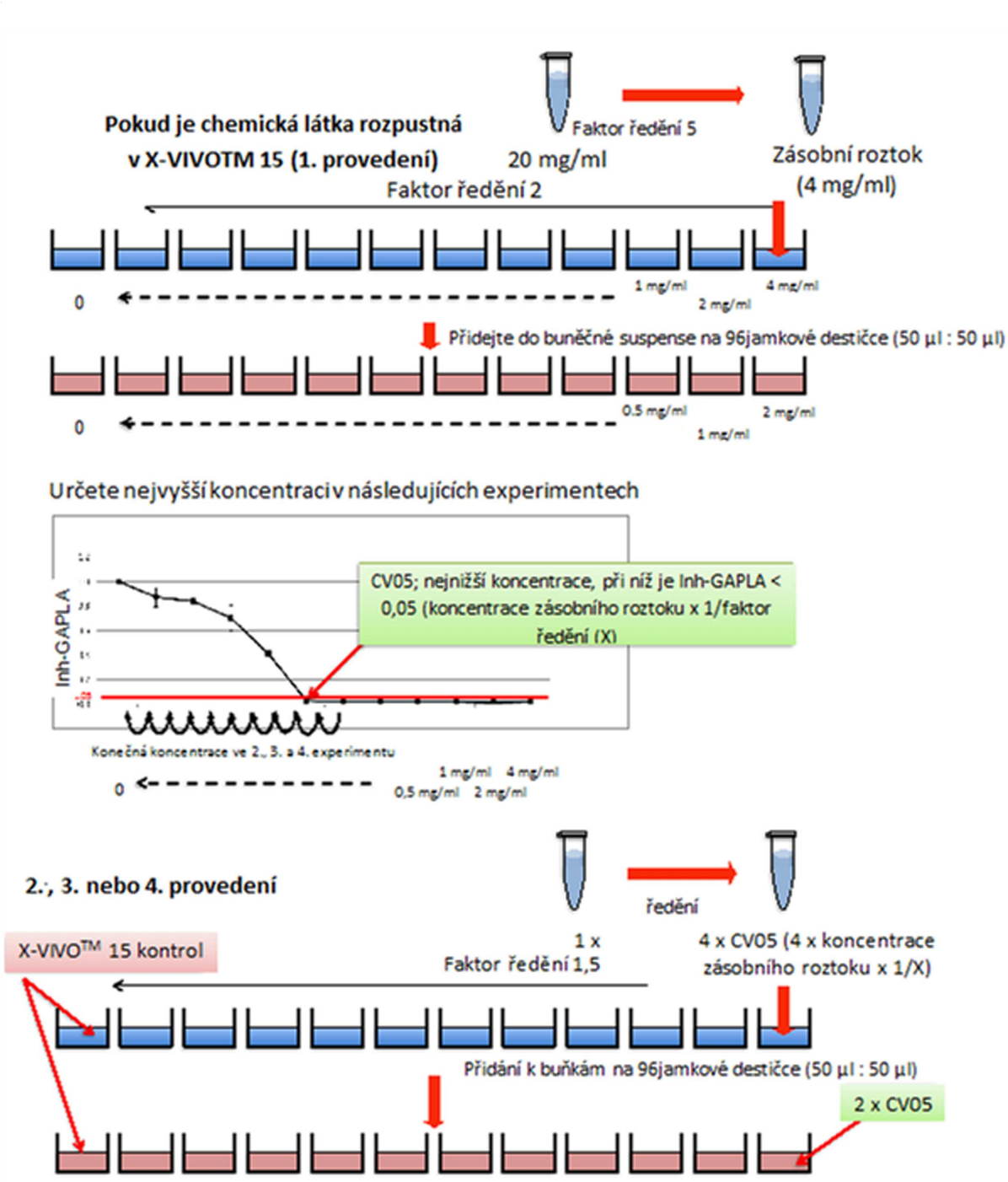
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Protože GAPLA je jmenovatelem nIL8LA, působí extrémně malá hodnota velkou odchylku v nIL8LA. Hodnoty Ind-IL8LA s extrémně malou hodnotou Inh-GAPLA (méně než 0,05) mohou být tedy považovány za špatnou přesnost.

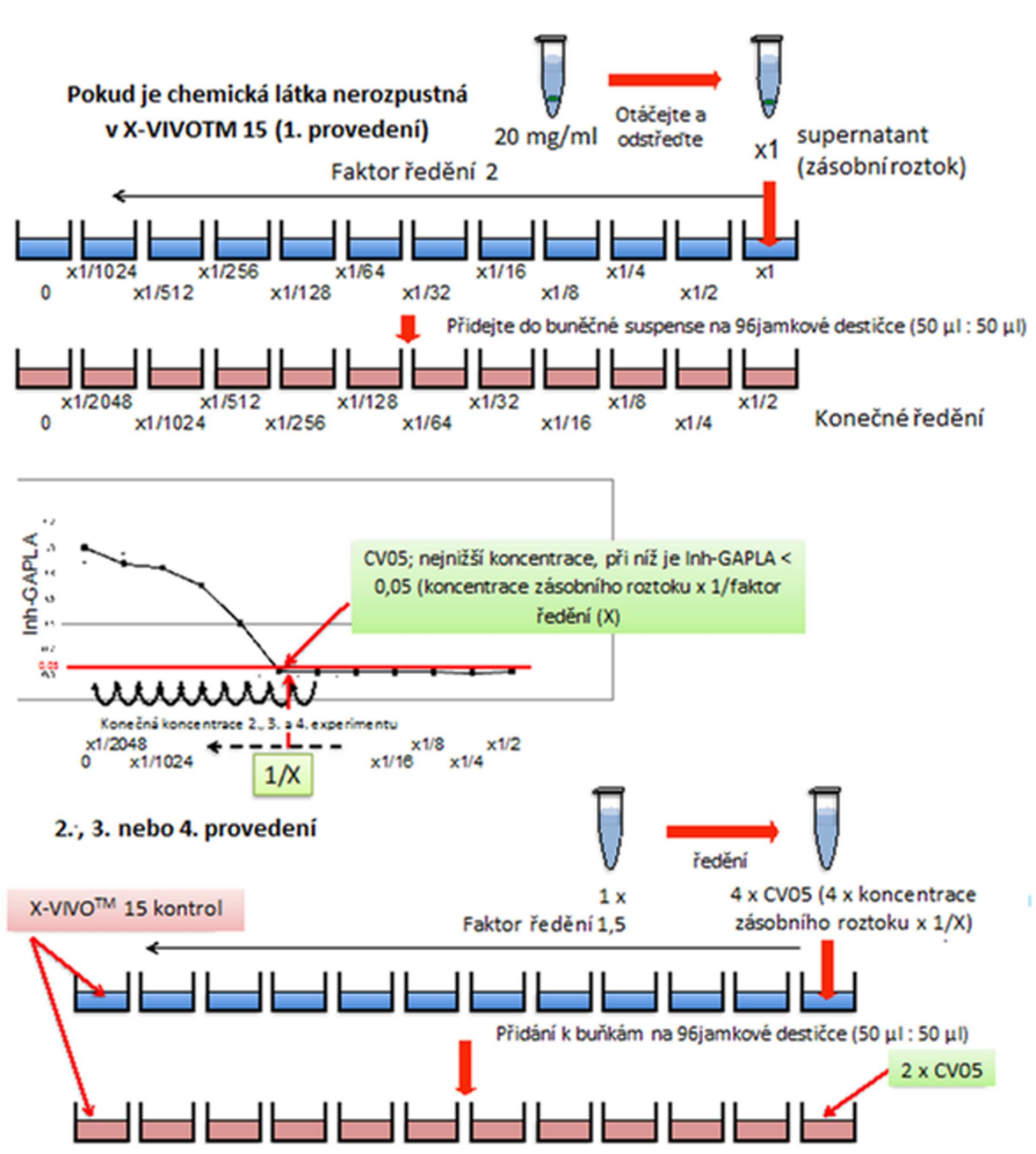
Dodatek 3.5

SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ CHEMICKÝCH LÁTEK PRO ANALÝZU IL-8 LUC.

a) Pro chemické látky rozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml

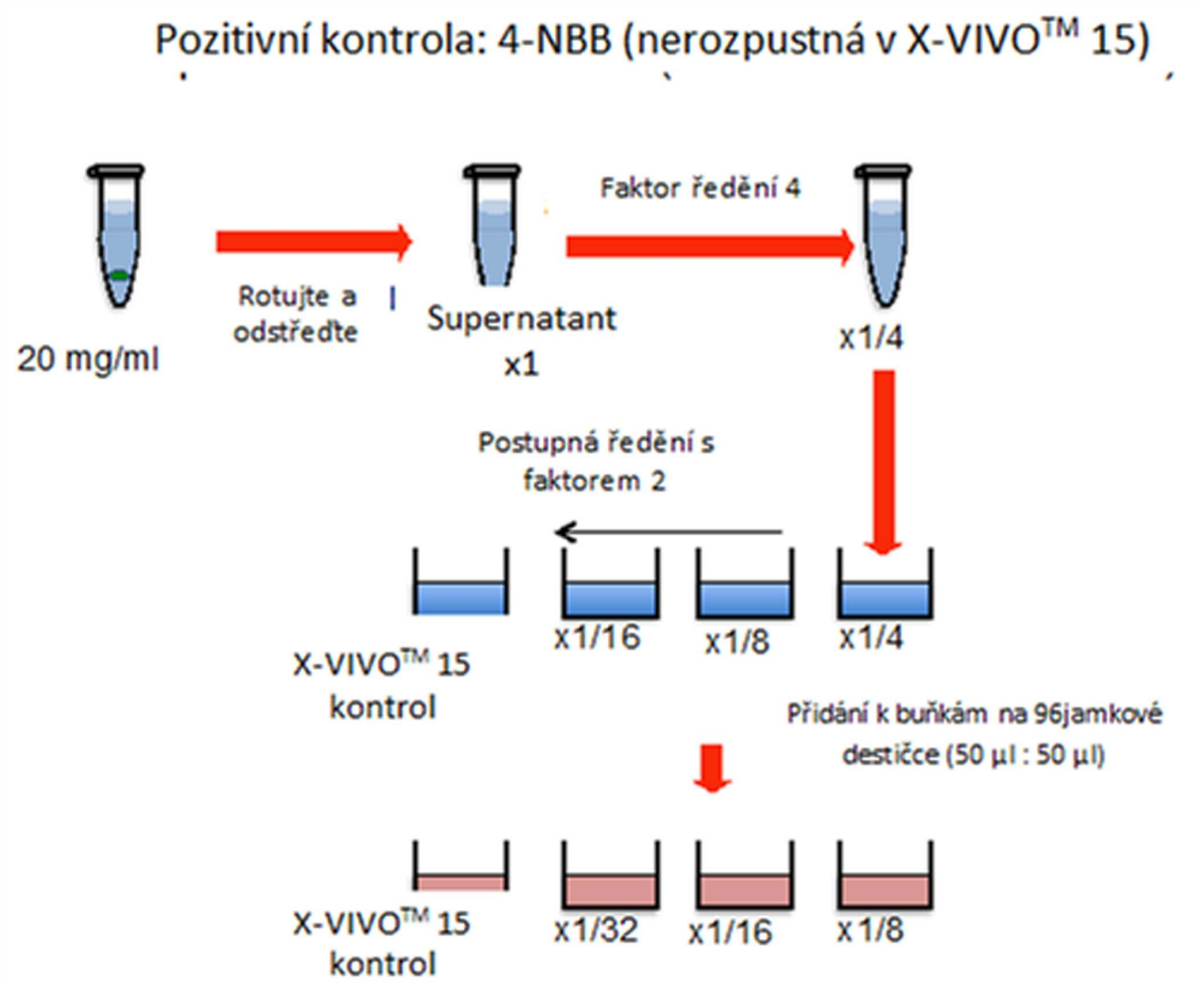


b) Pro chemické látky nerozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml



Dodatek 3.6

SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ 4-NBB PRO POZITIVNÍ KONTROLU ANALÝZY IL-8 LUC.



“

9) V části C se doplňují tyto kapitoly:

„C.52 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA REPRODUKCE HALANČÍKA JAPONSKÉHO (MEOGRT)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 240 (2015). Rozšířená jednogenerační zkouška reprodukce halančíka japonského (MEOGRT) popisuje souhrnnou zkušební metodu založenou na rybách exponovaných v několika generacích, aby byly získány údaje relevantní pro ekologickou nebezpečnost a posouzení rizik chemických látek, včetně pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC). Expozice v MEOGRT pokračuje až do vylíhnutí (do dvou týdnů po fertilizaci) v druhé (F2) generaci. Pro odůvodnění užitečnosti rozšíření generace F2 do doby po vylíhnutí by byly nutné další studie; v současnosti nejsou k dispozici dostatečné informace, aby bylo možné stanovit relevantní podmínky nebo kritéria pro rozšíření generace F2. Tato zkušební metoda se však může aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje. Například pokyn k rozšíření generace F2 prostřednictvím reprodukce může být za určitých podmínek potenciálně užitečný (např. chemické látky s vysokým potenciálem biokoncentrace nebo indikacemi mezigeneračních účinků u jiných taxonů). Tato zkušební metoda se může používat na posouzení potenciálních chronických účinků chemických látek, včetně potenciálních endokrinních disruptorů, na ryby. Metoda klade primární důraz na potenciální účinky relevantní pro populaci (a to negativní dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukci) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace (EC_x), ačkoliv je třeba poznamenat, že metody EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto typu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkušebních koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x, což může také způsobit významné problémy v oblasti dobrých životních podmínek zvířat vzhledem k velkému počtu použitých zvířat. Pro chemické látky, které nevyžadují hodnocení „několika generací", nebo chemické látky, které nejsou potenciálními endokrinními disruptory mohou být vhodnější jiné zkušební metody (1). Vhodným druhem pro použití u této zkušební metody je halančík japonský vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti stanovit jeho genetické pohlaví (2), což je považováno za kritickou součást této zkušební metody. Konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této metodě jsou použitelné u halančíka japonského samotného. Jiné druhy malých ryb (např. danio pruhované) mohou být adaptovány na podobný zkušební protokol.

2. Tato zkušební metoda měří několik biologických cílových parametrů. Primární důraz je kladen na relevantní parametry, a to potenciální nežádoucí účinky na populaci, včetně přežití, celkového vývoje, růstu a reprodukce. Sekundárně za účelem zajištění mechanistických informací a spojení mezi výsledky z jiných druhů terénních a laboratorních studií, pokud budou dodatečně zjištěny důkazy, že chemická látka působí jako potenciální endokrinní disruptor (např. androgenní nebo estrogenní aktivita v jiných zkouškách a analýzách), se další užitečné informace získávají měřením mRNA *vitelogeninu (vtg)* (nebo bílkoviny vitelogeninu, VTG), fenotypových sekundárních pohlavních charakteristik (SSC) souvisejících s genetickým pohlavím a vyhodnocením histopatologie. Je třeba poznamenat, že pokud neexistuje podezření, že zkoušená chemická látka nebo její metabolity jsou endokrinní disruptory, nemusí být nutné měřit tyto sekundární cílové parametry a může být vhodnější použít studie, které jsou méně náročné na zdroje a zvířata (1). Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude zkušební metoda přezkoumána a v případě potřeby bude revidována z hlediska nabytých zkušeností. Údaje mohou být použity na úrovni 5 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (3). Zkušební metoda začíná expozicí dospělých ryb (generace F0) zkoušené chemické látce v průběhu reprodukční fáze. Expozice pokračuje po dobu vývoje a reprodukce v generaci F1 a líhnutí v generaci F2; analýza tak umožňuje hodnocení strukturálních a aktivačních endokrinních drah. Při interpretaci cílových parametrů souvisejících s endokrinním systémem může být provedena analýza průkaznosti výsledků.

4. Zkouška by měla zahrnovat adekvátní počet jednotlivců, aby byla zajištěna dostatečná síla na hodnocení cílových parametrů relevantních pro reprodukci (viz dodatek 3) a aby bylo zároveň zajištěno, že počet použitých zvířat je minimální potřebný počet s ohledem na dobré životní podmínky zvířat. Vzhledem k velkému počtu použitých pokusných zvířat je důležité pečlivě zvažovat, zda je nutné zkoušku provést s ohledem na existující údaje, které již mohou obsahovat podstatné informace o mnoha cílových parametrech ve zkoušce MEOGRT. V tomto směru může určitou pomoc poskytnout rámec OECD pro zkoušení toxicity na rybách (1).

5. Tato zkušební metoda je primárně určena na rozlišení účinků jedné látky. Pokud je však potřebná zkouška směsi, je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel.

6. Před zahájením zkoušky je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška se zahajuje exponováním pohlavně zralých samců a samic (alespoň 12 týdnů po fertilizaci) v chovných párech po dobu 3 týdnů, během nichž se zkoušená chemická látka distribuuje v organismu rodičovské generace (F0) podle svého toxikokinetického chování. Pokud možno co nejblíže prvnímu dni čtvrtého týdne se sesbírají vajíčka a zahájí se generace F1. V průběhu chovu generace F1 (celkem 15 týdnů) se posuzuje líhnivost a přežití. Kromě toho se 9–10 týdnů po fertilizaci odeberou vzorky ryb pro stanovení vývojových cílových parametrů a od 12. do 14. týdne po fertilizaci se posuzuje tření. Po třetím týdnu posuzování reprodukce a chovu až do ukončení líhnutí se zahajuje generace F2.

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

8. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být ≥ 60 % nasycení vzduchem,

— střední teplota vody by se měla po celou dobu trvání studie pohybovat mezi 24 a 26 °C. Krátké odchylky od střední teploty v jednotlivých akváriích by neměly být větší než 2 °C,

— střední plodivost kontrol v každé generaci (F0 a F1) by měla být větší než 20 vajíček na pár denně. Fertilita všech vajíček vyprodukovaných v průběhu posuzování by měla být větší než 80 %. Kromě toho 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů (> 65 %) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně,

— líhnivost vajíček by u kontrol měla být ≥ 80 % (průměr) (v každé generaci F1 a F2),

— přežití po vylíhnutí do 3. týdne po fertilizaci a od 3. týdne po fertilizaci až do ukončení zkoušky pro generaci F1 (tj. 15 týdnů po fertilizaci) by u kontrol (F1) mělo být ≥ 80 % (průměr), respektive ≥ 90 % (průměr),

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot.

Co se týká teploty vody, i když nejde o kritérium platnosti, replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

9. I když může být ve skupinách s vyšší expozicí pozorována snížená reprodukce, mělo by docházet k dostatečné reprodukci alespoň v třetí nejvyšší skupině a ve všech nižších skupinách generace F0, aby se naplnily inkubátory. Kromě toho by mělo být adekvátní přežití embryí v třetí nejvyšší a v nižších expozičních skupinách generace F1, aby bylo možné hodnotit cílový parametr při odebírání vzorků nedospělých zvířat (viz odstavce 36 a 38 a dodatek 9). Dále by mělo být alespoň minimální přežití po vylíhnutí (~20 %) v druhé nejvyšší expoziční skupině generace F1. Nejde o kritéria platnosti jako taková, ale o doporučení, aby bylo možné vypočítat robustní koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

10. Je-li zjištěna odchylka od kritérií platnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti výsledků zkoušek a tyto odchylky a úvahy by měly být zahrnuty do závěrečné zprávy.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Normální laboratorní vybavení, a zejména:

a) oximetr a pH-metr;

b) vybavení pro stanovení tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování;

d) nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady a hustotě obsádky (viz dodatek 3);

e) dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ±0,5 mg).

Voda

12. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Pro ujištění, že ředicí voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 2. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ±0,5.

Systém expozice

13. Návrh a materiály použité pro systém expozice nejsou stanoveny. Pro výstavbu zkušebního systému by mělo být použito sklo, nerezavějící ocel nebo jiný chemicky inertní materiál, který nebyl kontaminován v průběhu předchozích zkoušek. Pro účely této zkoušky může vhodný systém expozice sestávat z kontinuálního průtokového systému (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Zkušební roztoky

14. Zásobní roztok zkoušené chemické látky se do systému expozice přivádí vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Zkušební roztok v každé komoře se adekvátně vyměňuje (např. minimálně 5krát/den až 16krát/den nebo max. průtok 20 ml/min) v závislosti na stabilitě zkoušené chemické látky a kvalitě vody.

15. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (14). Měla by být vynaložena maximální snaha nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože: 1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu" souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) v případě, že nejsou k dispozici dřívější údaje, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD č. 23 ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (15). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních údajů o používání rozpouštědla. Jsou-li použita jako nosiče rozpouštědla, je nutné vyhodnotit kontrolní měření nejen při použití vhodného rozpouštědla, ale i při kontrolách (negativních), kdy se rozpouštědlo nepoužije (pouze ředicí voda). V případě, že se použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (15) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnižší (např. < 20 µl/l) aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (16).

Zkušební organismy

Výběr a chov ryb

16. Zkušebním druhem je halančík japonský *Oryzias latipes* vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti určit genetické pohlaví. I když mohou být na podobný zkušební protokol adaptovány jiné druhy malých ryb, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka japonského (viz odstavec 1). Halančíka japonského lze snadno přimět, aby se rozmnožoval v zajetí; pro jeho chov existují publikované metody (17) (18) (19) a k dispozici jsou údaje z krátkodobých zkoušek letality, raného vývojového stádia i celého životního cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Všechny ryby se chovají v režimu 16 h světlo, 8 h tma. Ryby se krmí živými larvami (nauplie) žábronožky (druh *Artemia*), které mohou být v případě potřeby doplněny komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů.

17. Pokud jsou dodržovány vhodné metody chovu, není nutný žádný konkrétní kultivační protokol. Halančík japonský může být chován například ve dvoulitrových nádržích s 240 rybími larvami v každé nádrži do 4. týdne po fertilizaci, poté mohou být ryby chovány ve dvoulitrových nádržích s 10 rybami v každé nádrži do 8. týdne po fertilizaci, kdy se přemístí v chovných párech do dvoulitrových nádrží.

Aklimatizace a výběr ryb

18. Zkušební ryby by měly pocházet z laboratorní populace, která byla alespoň dva týdny před zkouškou udržována v podmínkách kvality vody a osvětlení podobných podmínkám použitým ve zkoušce (poznámka: toto aklimatizační období není předexpoziční období *in situ*). Doporučuje se, aby testovací ryby byly pořizovány z vlastní kultivace, neboť přeprava dospělých ryb je stresující a může narušit spolehlivé tření. Ryby se krmí larvami (nauplia) žábronožky dvakrát denně po celou dobu chovného období i v průběhu expoziční fáze a v případě potřeby mohou být dokrmovány komerčně dostupným vločkovým krmivem. Aby byla zajištěna adekvátní replikace, považuje se za potřebné zahájit tuto zkoušku minimálně se 42 chovnými páry (54 chovnými páry, jestliže je vyžadována kontrola s rozpouštědlem částečně v důsledku nedostatku dřívějších údajů na podporu použití pouze kontroly s rozpouštědlem i bez rozpouštědla). Dále je třeba ověřit, že každý chovný pár generace F0 je XX-XY (tj. normální komplement pohlavních chromozomů u každého pohlaví), aby nedošlo k možnému zahrnutí spontánních samců XX (viz odstavec 39).

19. V průběhu aklimatizační fáze se zaznamenává mortalita chovaných ryb, přičemž po 48hodinovém stabilizačním období se použijí tato kritéria:

— mortalita větší než 10 % chované populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: vyměnit celou obsádku,

— mortalita mezi 5 % a 10 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: aklimatizace po dobu sedmi dalších dnů až dvoutýdenní aklimatizační období; je-li mortalita během následujících sedmi dnů větší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita menší než 5 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: násada se přijímá.

20. Během dvoutýdenního aklimatizačního období před zkouškou a během expozice nesmí být u ryb léčeny žádné nemoci a léčba nemocí by měla být pokud možno zcela vyloučena. Ryby s klinickými známkami onemocnění by neměly být ve studii používány. Měl by být veden záznam pozorování a všech profylaktických a terapeutických ošetření nemocí v průběhu chovného období předcházejícího zkoušce.

21. Fáze expozice začíná s pohlavně dimorfními dospělými rybami s geneticky stanoveným pohlavím z laboratorní dodávky reprodukčně zralých zvířat chovaných při 25 ± 2 °C. Ryby by měly být prokazatelně chovné (tj. ryby, které měly životaschopné potomstvo) v průběhu týdne před expozicí. Rozpětí individuálních hmotností podle pohlaví na začátku zkoušky by pro celou skupinu ryb použitých ve zkoušce mělo být pokud možno ±20 % aritmetického průměru hmotností stejného pohlaví. Před zkouškou by se měl zvážit menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti. Vybrané ryby by měly být alespoň 12 týdnů po fertilizaci a měly by vyvážit ≥ 300 mg u samiček a ≥ 250 mg u samečků.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

22. Doporučuje se použít pět koncentrací chemické látky plus kontrolu (kontroly). Při výběru rozmezí zkušebních koncentrací by měly být zvažovány všechny zdroje informací, včetně kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR), údajů odvozených z analogických látek, výsledků zkoušek na rybách, jako jsou analýzy akutní toxicity (kapitola C.1 této přílohy), krátkodobá analýza reprodukce ryb (kapitola C.48 této přílohy) a další zkušební metody např. kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 nebo C.49 této přílohy (21) (22) (23) (24) (25) (26), jestliže jsou k dispozici, nebo v případě potřeby ze zkoušky ke stanovení rozsahu, případně včetně reprodukční fáze. V případě potřeby může být provedena zkouška ke stanovení rozsahu za podmínek (kvalita vody zkušební systém, násada) podobných podmínkám použitým v hlavní zkoušce. Jestliže je nezbytné použít rozpouštědlo a nejsou k dispozici žádné předchozí údaje, může být k určení vhodnosti rozpouštědla použita zkouška ke stanovení rozsahu. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě, 10 mg/l nebo 1/10 z 96h-LC50 (27). Nejnižší koncentrace by měla být 10krát až 100krát nižší než nejvyšší koncentrace. Použití pěti koncentrací v této zkoušce umožňuje nejen změřit vztah mezi dávkou a odpovědí, ale poskytuje také nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC), které jsou v některých regulačních programech nebo jurisdikcích nezbytné pro posouzení rizik. Obecně je rozdíl mezi nominálními koncentracemi zkoušené chemické látky mezi jednotlivými úrovněmi expozice ≤ 3,2.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

23. Mělo by být použito minimálně šest replikátů zkušebních komor na každou zkoušenou koncentraci (viz dodatek 7). V průběhu reprodukční fáze (s výjimkou generace F0) se struktura replikací u hodnocení plodivosti zdvojnásobí, přičemž každý replikát má pouze jeden chovný pár (viz odstavec 42).

24. Kromě zkušebních koncentrací by měla být nasazena kontrolní skupina v ředicí vodě a podle potřeby kontrolní skupina s rozpouštědlem. Pro kontroly se použije dvojitý počet replikátů komor, aby byla zajištěna adekvátní statistická síla (tj. pro kontroly by mělo být použito alespoň dvanáct replikátů). V průběhu reprodukční fáze se počet replikátů v kontrolách zdvojnásobí (tj. minimálně 24 replikátů a každý replikát má jen jeden chovný pár). Po reprodukci by měly kontrolní replikáty obsahovat maximálně 20 (rybích) embryií.

POSTUP

Zahájení zkoušky

25. Reprodukčně aktivní dospělé ryby použité pro zahájení generace F0 zkoušky se vybírají podle dvou kritérií: věku (obvykle více než 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci) a hmotnosti (měla by být ≥ 300 mg u samiček a ≥ 250 mg u samečků).

26. Páry samička-sameček, které splňují výše uvedené specifikace, se při zahájení zkoušky přemístí jako jednotlivé páry do každého replikátu nádrže, tj. dvanáct replikátů v kontrolních skupinách a šest replikátů ve skupinách exponovaných chemické látce. Tyto nádrže se náhodně rozdělí na expozice (např. T1–T5 a kontrola) a replikát (např. A–L u kontrol a A–F u expozice) a poté se umístí do expozičního systému s příslušným průtokem do každé nádrže.

Podmínky expozice

27. Úplný souhrn zkušebních parametrů a podmínek lze najít v dodatku 3. Při dodržení těchto specifikací by kontrolní ryby měly mít hodnoty sledovaných parametrů podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.

28. V průběhu zkoušky se měří alespoň v jedné zkušební nádrži každé expoziční skupiny a kontroly množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. S výjimkou teploty by se měla tato měření provádět minimálně jednou týdně po celou dobu expozice. Střední teplota vody by se měla po celou dobu zkoušky pohybovat mezi 24 a 26 °C. Teplota by se měla měřit každý den po celou dobu expozice. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ±0,5. Replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

Doba trvání expozice

29. Ve zkoušce jsou pohlavně reprodukční ryby exponovány od generace F0 po dobu tří týdnů. V týdnu 4 přibližně v den zkoušky 24 se založí generace F1 a chovné páry z generace F0 se humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka (viz odstavec 34). Poté následuje expozice generace F1 po dobu dalších 14 týdnů (celkem 15 týdnů u generace F1) a generace F2 po dobu dvou týdnů až do vylíhnutí. Celková doba trvání zkoušky je primárně 19 týdnů (tj. až do vylíhnutí generace F2). Časové plány zkoušky jsou uvedeny v tabulce 2 a dále podrobně vysvětleny v dodatku 9.

Krmný režim

30. Ryby mohou být krmeny libovolně dlouho žábronožkou, rod *Artemia,* (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by mělo být pravidelně analyzováno, zda neobsahuje kontaminanty, např. organochlorové pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenyly (PCB). Měla by být vyloučena potrava se zvýšenou hladinou endokrinně aktivních látek (tj. fytoestrogenů), která by mohla narušit odpověď zkoušky. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží odstraňují podle potřeby, např. opatrným odsátím ze dna jednotlivých nádrží pomocí odsávačky. Jednou nebo dvakrát týdně je třeba vyčistit také stěny a dno každé nádrže (např. oškrábáním špachtlí). Příklad harmonogramu krmení lze najít v dodatku 5. Množství krmiva závisí na počtu ryb v každém replikátu. Proto se množství krmiva sníží, pokud v replikátu došlo k úhynu.

Analytické stanovení a měření

31. Před započetím předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek. Měly by se stanovit všechny analytické metody, které budou zapotřebí, včetně dostatečných znalostí o stabilitě chemické látky ve zkušebním systému. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe alespoň každý týden v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají.

32. V průběhu zkoušky se průtoky ředicího a zásobního roztoku v určitých intervalech kontrolují (např. minimálně třikrát týdně). Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ±20 % středních naměřených hodnot, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. V případě chemických látek, které se v rybách výrazně akumulují, se mohou zkušební koncentrace snižovat s tím, jak ryba roste. V těchto případech se doporučuje upravit rychlost výměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkušební koncentrace udrženy v maximální možné míře konstantní.

Pozorování a měřené parametry

33. Měřené parametry zahrnují plodivost, fertilitu, líhnutí, růst a přežití za účelem zhodnocení možných účinků na úrovni populace. Také pozorování chování by se mělo provádět denně a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Další mechanistické parametry zahrnují hladiny hepatické *vtg* mRNA nebo bílkoviny VTG určené na základě imunotestu (28), pohlavní fenotypové markery, jako jsou charakteristické samčí papily na řitní ploutvi, histologické vyšetření pohlaví podle gonád a histopatologické vyšetření ledvin, jater a gonád (viz seznam parametrů v tabulce 1). Všechny tyto specifické parametry se hodnotí v souvislosti s určením genetického pohlaví jednotlivce podle přítomnosti nebo nepřítomnosti genu *dmy* určujícího samčí pohlaví halančíka japonského (viz odstavec 41). Dále se hodnotí také doba do tření. Kromě toho lze jednoduché podíly fenotypového pohlaví odvodit podle informací o počtu papil na řitní ploutvi, které definují jednotlivé halančíky japonské jako samičky nebo samečky. Od této zkušební metody nelze očekávat, že bude detekovat menší odchylky od očekávaného podílu pohlaví, protože relativně malé počty ryb v každém replikátu nezajišťují dostatečnou statistickou sílu. V průběhu histopatologického vyšetření se také hodnotí gonády a provádí se mnohem silnější analýzy pro stanovení fenotypu gonád v souvislosti s genetickým pohlavím.

34. Hlavním účelem této zkušební metody je posoudit potenciální účinky zkoušené chemické látky relevantní pro populaci. Mechanistické parametry (VTG, SSC a některé účinky na histopatologii gonád) mohou rovněž pomoci při určování, zda je některý účinek zprostředkován endokrinní aktivitou. Tyto mechanistické parametry však mohou být rovněž ovlivněny systémovými a jinými toxicitami. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality zpozorované náhodně při histopatologickém vyšetření.

Humánní usmrcení ryb

35. Při ukončení expozice generace F0 a F1 a když se odebírá dílčí vzorek nedospělých ryb, by se ryby měly usmrtit přiměřeným množstvím roztoku anestetika (např. trikain methan sulfonát, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l), pufrovaného roztokem $NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný, číslo CAS 144-55-8) 300 mg/l, aby se snížilo podráždění sliznice. Jestliže ryby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je ryba usmrcena v důsledku morbidity, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou ryby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat ryby pro případnou histopatologii).

Nakládání s vajíčky a rybími larvami

Sběr vajíček od chovných párů pro namnožení další generace

36. Sběr vajíček se provádí první den (nebo v případě potřeby první dva dny) zkušebního týdne 4, aby se přešlo z generace F0 na generaci F1, a zkušebního týdne 18, aby se přešlo z generace F1 na generaci F2. Zkušební týden 18 odpovídá generaci F1, 15 týdnů pro fertilizaci dospělých ryb. Je důležité, aby byla z každé nádrže odebrána všechna vajíčka v den před započetím sběru vajíček, aby bylo zajištěno, že všechna vajíčka získaná od chovného páru jsou z jednoho tření. Po vytření někdy samičky halančíka japonského nosí svá vajíčka v blízkosti kloaky, dokud je nemohou uložit na substrát. Protože v nádrži žádný substrát není, mohou být vajíčka nalezena přichycená k samičce nebo na dně nádrže. Podle toho, kde se vajíčka nacházejí, ve zkušebním týdnu 4 generace F0 a ve zkušebním týdnu 18 generace F1 se opatrně oddělí od samičky nebo vysají ze dna. Všechna vajíčka shromážděná v rámci expozice se před distribucí do inkubačních komor sloučí.

37. Vlákna, která drží vytřená vajíčka dohromady, je třeba odstranit. Od každého chovného páru (1 pár na každý replikát) se sesbírají oplodněná vajíčka (maximálně 20), sloučí se podle expozice a systematicky rozdělí do vhodných inkubačních komor (dodatek 6, 7). Pomocí kvalitního stereoskopického mikroskopu lze vidět známky rané fertilizace/vývoje, jako je vznik fertilizační membrány (chorionu), probíhající dělení buněk nebo vznik blastuly. Inkubační komory mohou být vloženy do samostatného „inkubačního akvária“ sestaveného pro každou expozici (v takovém případě je třeba v nich měřit kvalitu vody a koncentrace zkoušené chemické látky) nebo do replikátu akvária, v němž budou chovány vylíhlé larvy (například eleutheroembryo). Pokud je potřebný druhý den sběru (zkušební den 23), všechna vajíčka z obou dnů se sloučí a poté se systematicky rozdělí do všech zkušebních replikátů.

Pěstování vajíček do vylíhnutí

38. Oplodněná vajíčka se průběžně promíchávají, *např.* v inkubátoru vzduchovými bublinkami nebo vertikálním kroužením inkubátoru. Mortalita oplodněných vajíček (embryí) se každý den kontroluje a zaznamenává. Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (dodatek 9). V den 7 po fertilizaci se promíchávání zastaví nebo sníží, aby se oplodněná vajíčka mohla usadit na dně inkubátoru. Podporuje to líhnutí, zpravidla následující den či po dvou dnech. U každé expozice a kontroly se spočítá (ze spojených replik) plůdek (mladé larvy; eleutheroembrya). Oplodněná vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole (obvykle 16. nebo 17. den po fertilizaci), se považují za neživotaschopná a zlikvidují se.

39. Do každé repliky nádrže se přenese dvanáct plůdků. Plůdek z inkubačních komor se sloučí a systematicky rozdělí do replik nádrží (dodatek 7). Lze to provést náhodným výběrem plůdku z expoziční skupiny a postupným přidáváním plůdku bez rozdílu do replikovaných akvárií. Každá z nádrží by měla obsahovat stejný počet (n = 12) vylíhlých larev (maximálně 20 larev v nádrži). Pokud není dostatek plůdku k zaplnění všech expozičních replikátů, doporučuje se zajistit, aby co možná nejvíce replikátůu mělo 12 plůdků. S plůdkem lze bezpečně manipulovat pomocí skleněných pipet s velkým vnitřním průměrem. Zbývající plůdek se humánně usmrtí anestetikem. V týdnech před sestavením chovných párů je třeba zaznamenat den, kdy bylo v každém replikátu pozorováno první tření.

Příprava chovných párů

Označení ploutví a určení genotypového pohlaví

40. Určení genotypového pohlaví označením ploutví se provádí v 9.–10. týdnu po fertilizaci (tj. zkušební týden 12–13 u generace F1). Všechny ryby v nádrži se anestetizují (s použitím schválených metod, např. IACUC) a z dorzální nebo ventrální špičky ocasní ploutve každé ryby se odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (29). Ryby z replikátu mohou být v replikátové nádrži umístěny do klícek, pokud možno jedna ryba na klícku. Alternativně lze do každé klícky umístit dvě ryby, pokud je lze od sebe odlišit. Jednou z metod je zastřihnout při odebírání vzorku tkáně ocasní ploutev různě (např. dorzální nebo ventrální špičku).

41. Genotypové pohlaví halančíka japonského se určí identifikovaným a sekvenovaným genem (*dmy*), který je umístěn na chromozomu Y. Přítomnost *dmy* indikuje jedince XY, a to bez ohledu na fenotyp, zatímco nepřítomnost *dmy* indikuje jedince XX, a to bez ohledu na fenotyp (30); (31). Z každé odstřižené ploutve se extrahuje kyselina deoxyribonukleová (DNA) a přítomnost nebo nepřítomnost genu *dmy* se určí metodami polymerázové řetězové reakce (PCR) (viz dodatek 9 v kapitole C.41 této přílohy nebo dodatek 3 a 4 v (29).

Sestavení chovných párů

42. Informace o fenotypovém pohlaví se použijí k sestavení chovných párů XX-XY bez ohledu na externí fenotyp, který může být pozměněn expozicí zkoušené chemické látce. V den po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně vyberou z každého replikátu dvě ryby XX a dvě ryby XY a sestaví se dva chovné páry XX-XY. Pokud v replikátu nejsou dvě ryby XX, případně dvě ryby XY, použije se vhodná ryba z jiných replikátů v rámci skupiny. Prioritou je mít doporučený počet replikovaných chovných párů (12) v každé expozici i v kontrolách (24). Při sestavování chovných párů se vyloučí ryby se zjevnými abnormalitami (problémy s plynovým měchýřem, páteřní deformity, extrémní odchylky velikosti atd.). V průběhu reprodukční fáze generace F1 by měla každá replikovaná nádrž obsahovat pouze jeden chovný pár.

Výběr vzorku nedospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Výběr vzorku ryb netvořících chovný pár

43. Po přípravě chovných párů se ryby, které nebyly vybrány k dalšímu chovu, humánně usmrtí za účelem měření cílových parametrů nedospělých jedinců ve zkušebním týdnu 12–13 (F1). Je velice důležité, aby bylo s rybami zacházeno tak, aby bylo stále možné vysledovat genotypové pohlaví stanovené pro výběr chovných párů k jednotlivým rybám. Všechny shromážděné údaje se analyzují v rámci genotypového pohlaví konkrétní ryby. Každá ryba se použije pro měření nejrůznějších cílových parametrů, včetně: stanovení míry přežití juvenilních/nedospělých ryb

(zkušební týdny 7–12/13 (F1)), nárůstu délky (standardní délka se může měřit, jestliže byla ocasní ploutev zkrácená v rámci výběru vzorku pro analýzu genetického pohlaví. Celková délka se může měřit, jestliže byl odebrán vzorek pouze části ocasní ploutve, dorzální nebo ventrální, pro stanovení genu *dmy*) a tělesné hmotnosti (tj. hmotnost ve vlhkém stavu, po osušení do sucha), jaterní *vtg* mRNA (nebo VTG) a papil řitní ploutve (viz tabulky 1 a 2). Nezapomeňte, že hmotnost a délka chovných párů je potřebná také pro výpočet středního růstu v expoziční skupině.

Odběr tkáňových vzorků a měření vitelogeninu

44. Játra se vypreparují a uloží při teplotě ≤ –70 °C až do doby měření *vtg* mRNA (neboVTG). Ocas ryby, včetně řitní ploutve, se konzervuje ve vhodné fixační látce (např. Davidsonův roztok) nebo se vyfotografuje, aby bylo možné později spočítat papily na řitní ploutvi. V tomto okamžiku mohou být odebrány i vzorky jiných tkání (tj. gonád) a uchovány. Koncentrace jaterní VTG se kvantifikuje metodou homologní ELISA (viz doporučené postupy pro halančíka japonského v dodatku 6 v kapitole C.48 této přílohy). Alternativně byly americkou agenturou EPA stanoveny metody pro kvantifikaci mRNA vtg, tj. extrakce mRNA genu *vtg I* ze vzorku jater a kvantifikace počtu kopií genu *vtg I* (na ng celkové mRNA) kvantitativní PCR (29). Místo stanovování počtu kopií genu *vtg* v kontrolní skupině a v expoziční skupině je metodou méně náročnou na zdroje i méně technicky obtížnou stanovit relativní (násobnou) změnu exprese *vtg I* z kontrolní skupiny a expoziční skupiny.

Druhotné pohlavní znaky

45. Za normálních okolností má papily, které se vyvinou na článcích některých paprsků řitní ploutve jako druhotná pohlavní charakteristika, pouze pohlavně dospělý sameček halančíka japonského, což představuje potenciální biomarker endokrinních disruptivních účinků. Metoda počítání papil na řitní ploutvi (počet článků s papilami) je uvedena v dodatku 8. Počet papil na řitní ploutvi u jednotlivce se také používá pro účely výpočtu jednoduchého podílu pohlaví v replikátu jako ukazatel, že daný jednotlivec je externě fenotypový sameček nebo samička. Halančík japonský s libovolným počtem větším než 0 je definován jako sameček; halančík japonský bez papil (0 papil) na řitní ploutvi je definován jako samička.

Posouzení plodivosti a fertility

46. Plodivost a fertilita se posuzují ve zkušebních týdnech 1 až 3 v generaci F0 a ve zkušebních týdnech 15 až 17 v generaci F1. Vajíčka od každého chovného páru se sbírají denně během 21 po sobě jdoucích dnů. Vajíčka se každé ráno jemně uvolní z vylovených samiček anebo se vysají ze dna akvária. Plodivost i fertilita se zaznamenávají denně pro každý replikovaný chovný pár. Plodivost je definována jako počet vytřených vajíček a fertilita je funkčně definována jako počet oplodněných a životaschopných vajíček v době počítání. Počítání by se mělo provést co nejdříve po sběru vajíček.

47. Plodivost replikátu se zaznamenává denně jako počet vajíček na chovný pár a analyzuje se podle doporučených statistických postupů s použitím středních hodnot replikátů. Fertilita replikátu je součet počtu fertilních vajíček vyprodukovaných chovným párem děleno součtem počtu vajíček vyprodukovaných tímto párem. Statistická fertilita se analyzuje jako podíl na replikát. Líhnivost replikátu je počet plůdků děleno počtem nasazených embryí (obvykle 20). Statistická líhnivost se analyzuje jako podíl na replikát.

Výběr vzorku dospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Odběr vzorků chovných párů

48. Po zkušebním týdnu 17 (tj. po úspěšném zahájení generace F2) se dospělí jedinci z generace F1 humánně usmrtí a hodnotí se různé sledované parametry (viz tabulky 1 a 2). Pořídí se obrazový záznam řitní ploutve pro posouzení papil na řitní ploutvi (viz dodatek 8) a/nebo se odebere ocas bezprostředně za kloakou a fixuje se pro pozdější spočítání papil. V tomto okamžiku může být případně odebrán vzorek části ocasní ploutve a archivován pro ověření genetického pohlaví (*dmy*). V případě potřeby může být odebrán vzorek tkáně pro zopakování analýzy *dmy* za účelem ověření genetického pohlaví konkrétní ryby. Před ponořením celého těla do fixační látky se otevře tělní dutina, aby byla umožněna perfúze příslušnými fixačními látkami (např. Davidsonův roztok). Pokud je však před fixací proveden vhodný permeabilizační krok, není třeba tělní dutinu otevírat.

Histopatologie

49. Každá ryba se histologicky vyšetří, zda gonadální tkáň není patologická (30), (29). Jak je zmíněno v odstavci 33, mohou být další mechanistické parametry hodnocené v této analýze (tj. VTG, SSC a některé gonadální histopatologické účinky) ovlivněny systémovou či jinou toxicitou. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality zpozorované náhodně při histopatologickém vyšetření. Lze zvážit „odečet" od skupiny s nejvyšší expozicí (v porovnání s kontrolou) do expozice bez účinku, doporučuje se však histopatologický postup konzultovat (29). Obvykle se zpracují/preparují všechny vzorky a poté je posoudí patolog. Při použití „odečtové" metody nezapomeňte, že postup podle Rao-Scotta a Cochrane-Armitage využívající dílčí testy (RSCABS) používá předpoklad, že se zvyšováním úrovně dávky se zvyšuje také biologický dopad (patologie). Síla analýzy se tedy ztratí, pokud bude posuzována pouze jedna vysoká dávka bez středně velkých dávek. Pokud není nezbytné provádět statistickou analýzu, aby mohlo být rozhodnuto, že vysoká dávka nemá žádný účinek, je tento postup přijatelný. Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp.

Další pozorování

50. Zkouška MEOGRT poskytuje údaje, které mohou být použity (např. při analýze průkaznosti výsledků) pro současné hodnocení alespoň dvou obecných typů drah nežádoucích účinků (AOP), které končí narušením reprodukční funkce: a) endokrinně mediované dráhy zahrnující narušení endokrinní osy hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) a b) dráhy, které působí snížení přežití, růstu (délky a hmotnosti) a rozmnožování prostřednictvím neendokrinně mediované toxicity. V této zkoušce jsou zahrnuty také parametry obvykle měřené ve zkouškách chronické toxicity, jako je zkouška celého vývojového cyklu a zkouška raných vývojových stádií, a tyto parametry mohou být použity na vyhodnocení nebezpečnosti, kterou představují neendokrinně mediované toxické způsoby účinku i endokrinně mediované dráhy toxicity. V průběhu zkoušky by se mělo provádět denně pozorování chování a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Dále by se měla zaznamenat veškerá mortalita a přežití do redukce ryb (zkušební týden 6/7), přežití po redukci do odběru vzorku nedospělých jedinců (v týdnu 9–10 po fertilizaci) a vypočítat přežití od spárování do odběru vzorku dospělých ryb.

Tabulka 1

Přehled sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT (*)

Vývojové stádium	Ukazatel	Generace
Embryo (2 týdny po fertilizaci)	Vylíhnutí (% a doba do vylíhnutí)	F1, F2
Mladé ryby (4 týdny po fertilizaci)	Přežití	F1
Nedospělé ryby (9 nebo 10 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	
	Vitelogenin (mRNA nebo bílkovina)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Poměr pohlaví podle vnějších znaků	
	Doba do 1. vytření	
Dospělý jedinec (12–14 týdnů po fertilizaci)	Reprodukce (plodivost a fertilita)	F0, F1
Dospělý jedinec (15 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Histopatologie (gonády, játra, ledviny)	

(*) Tyto parametry se statisticky analyzují.

HARMONOGRAM

51. Harmonogram zkoušky MEOGRT znázorněný v tabulce 2 ukazuje průběh zkoušky. Zkouška MEOGRT zahrnuje 4 týdny expozice do vývoje dospělých jedinců generace F0, 15 týdnů expozice do generace F1 a dobu expozice pro druhou generaci (F2) až do vylíhnutí (2 týdny pro fertilizaci). Průběh zkoušky MEOGRT je shrnut v dodatku 9.

Tabulka 2

Harmonogram expozice a měření sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT

Harmonogram expozice a sledované parametry u zkoušky MEOGRT

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vývojové stádium					**Embryo**					**Larva**					**Mladá ryba**			**Nedospělá ryba**	**Dospělá ryba**
Sledované vlastnosti																			
Plodnost	F_0														F_1				
Fertilita	F_0														F_1				
Vylíhnutí					F_1														F_2
Přežití						F_1						F_1						F_1	
Růst				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenin												F_1							
Druhotné pohlavní znaky												F_1						F_1	
Histopatologie																		F_1	
Zkušební týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Uspořádání experimentu má 7 skupin replikátů
  - 5 pro expozici zkoušené chemické látce
  - 2 pro kontrolní expozici (4, pokud je použito rozpouštědlo)
- Uspořádání v rámci skupiny
  - 12 replikátů pro reprodukci, patologii a SSC dospělých jedinců (týdny 10 až 18)
  - 6 replikátů pro vylíhnutí, přežití, Vtg a - SSC a růst nedospělých jedinců (týdny 1 až 9)

SSC: druhotné pohlavní znaky; Wks: týdny;
Vtg: vitelogenin

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Statistická analýza

52. Protože se pro všechny pokusné ryby stanoví genotypové pohlaví, je třeba údaje analyzovat pro každé genotypové pohlaví samostatně (tj. samečci XY a samičky XX). V opačném případě by se výrazně snížila statistická síla jakékoli analýzy. Statistická analýza údajů by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu OECD *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32) (Současné přístupy ke statistické analýze dat týkajících se údajů o ekotoxicitě: Pokyny k použití). Další pokyny ke statistické analýze jsou uvedeny v dodatku 10.

53. Uspořádání experimentu a výběr statistických testů by měl umožňovat dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC (32). Vykazování příslušných koncentrací vyvolávajících účinky a příslušných parametrů může záviset na regulačním rámci. Je třeba určit procentuální změnu u každého ukazatele, který má být zjištěn nebo odhadnut. Aby to bylo možné, mělo by být uspořádání experimentu přesně přizpůsobeno. Není pravděpodobné, že stejná procentuální změna platí pro všechny ukazatele, a není ani pravděpodobné, že je možné naplánovat proveditelný experiment, který splní tato kritéria u všech ukazatelů. Za účelem naplánování experimentu vhodným způsobem je proto důležité zaměřit se na ty ukazatele, které jsou důležité pro daný experiment. V dodatku 10 je uvedeno statistické schéma a pokyny, které jsou vodítkem při zpracování údajů a při výběru nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být použit. Mohou být použity i jiné statistické metody za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

54. Bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady opakování pomocí analýzy rozptylu nebo pomocí kontingenční tabulky a na základě této analýzy použít dostatečné, vhodné metody statistické analýzy. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny se doporučuje test sestupného trendu (např. Jonckheerův-Terpstrův test) pro kontinuální odpovědi. Nejsou-li údaje v souladu s monotónní odpovědí na koncentraci, je třeba použít Dunnettův test nebo Dunnův test (v případě potřeby po adekvátní transformaci dat).

55. U plodivosti se vajíčka počítají denně, ale analýza může být provedena jako celkový počet vajíček nebo jako opakované měření. Podrobnosti o analyzování tohoto parametru jsou uvedeny v dodatku 10. Pro histopatologické údaje, které jsou ve formě stupně závažnosti, byl vypracován nový statistický test, Rao-Scottův, Cochranův-Armitageův test využívající dílčí testy (RSCABS) (33).

56. Všechny sledované parametry pozorované při expozicích chemické látce, které jsou významně odlišné od příslušných kontrol, je třeba vykázat.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných úrovní expozice

57. Při určování toho, zda opakování nebo celá expozice vykazují zjevnou toxicitu a měly by být z analýzy vyřazeny, se zvažuje několik faktorů. Zjevná toxicita je definována jako > 4 úhyny v každém opakování mezi týdnem 3 a 9 po fertilizaci, které nelze vysvětlit technickou chybou. Jiné příznaky zjevné toxicity zahrnují krvácení, nestandardní chování, nestandardní plavání, anorexii a jakékoli jiné klinické příznaky choroby. Při subletálních příznacích toxicity mohou být nezbytná kvalitativní hodnocení, která by měla být vždy prováděna ve srovnání s kontrolní skupinou v ředicí vodě (pouze čistá voda). Jestliže nejvyšší expozice vykazuje (vykazují) zjevnou toxicitu, doporučuje se, aby byly tyto expozice z analýzy cenzurovány.

Kontroly s rozpouštědlem

58. Použití rozpouštědla by mělo být zvažováno pouze jako poslední možnost, když byly uváženy všechny ostatní možnosti dávkování chemické látky. Je-li použito rozpouštědlo, měla by být souběžně provedena u kontrolní skupiny zkouška s ředicí vodou. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla. To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředicí vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředicí vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředicí vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s ředicí vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředicí vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

59. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka: fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti.

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen).

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh:

— vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

Zkušební podmínky:

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet plůdků v každém replikátu),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),

— výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušebního média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily celková kritéria validity,

— následující údaje o kontrolních (plus kontrole s rozpouštědlem, když je použita) a expozičních skupinách: líhnutí (líhnivost a doba do vylíhnutí) pro generace F1 a F2, přežití po vylíhnutí u generace F1, růst (délka a tělesná hmotnost) u generace F1, genotypové pohlaví a rozlišení pohlaví (např. druhotné pohlavní znaky podle papil na řitní ploutvi a histologie gonád) u generace F1, fenotypové pohlaví u generace F1, druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi) u generace F1, mRNA *vtg* (nebo bílkovina VTG) u generace F1, histopatologické vyšetření (gonády, játra a ledviny) u generace F1 a reprodukce (plodivost a fertilita) u generace F0, F1, (viz tabulky 1 a 2),

— metoda statistické analýzy (regresní analýza nebo analýza rozptylu) a zpracování údajů (použité statistické testy a modely),

— koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,

— nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při p = 0,05), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 90 % nebo 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,

— všechny odchylky od této zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.

60. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

LITERATURA

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-*Tert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupné na: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: s. 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: s. 330-338.

(21) Kapitola C.15 této přílohy, Zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku.

(22) Kapitola C.37 této přílohy, 21denní zkouška na rybách: krátkodobý screening estrogenní a androgenní aktivity a inhibice aromatázy.

(23) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.

(24) Kapitola C.48 této přílohy: Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.

(25) Kapitola C.47 této přílohy, Zkouška toxicity v raných fázích života ryb.

(26) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: s. 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs

ELISA: enzymová imunosorpční analýza

Plodivost = počet vajíček

Fertilita = počet životaschopných vajíček/plodivost

Délka k vidlici (FL) označuje délku od špičky tlamy po průsečík paprsků ocasní ploutve a používá se u ryb, u kterých je obtížné určit, kde končí páteř (www.fishbase.org)

Líhnivost = plůdky/počet embryí nasazených do inkubátoru

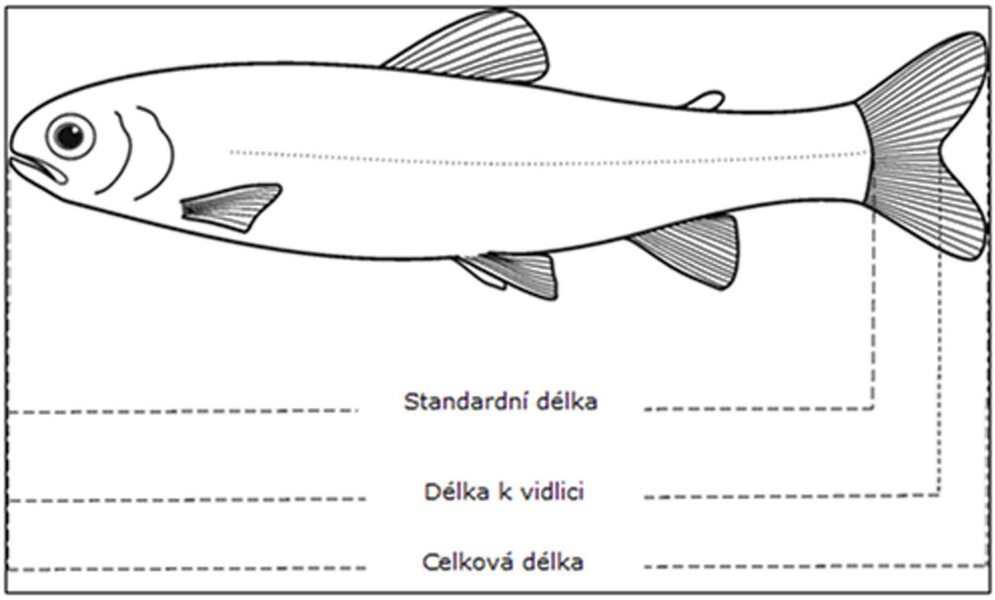
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Instituciální výbor pro péči o zvířata a jejich používání)

Standardní délka (SL) označuje délku ryby měřenou od špičky tlamy po konec posledního obratle nebo po konec ocasního násadce ve střední části. Jednoduše řečeno, tato míra nezahrnuje délku ocasní ploutve (www.fishbase.org).

Celková délka (TL) označuje délku od špičky tlamy po konec delšího laloku ocasní ploutve, obvykle měřenou s laloky sevřenými podél střední linie. Je to míra po přímce, neměří se přes zaoblení těla (www.fishbase.org).

Obrázek 1

Popis různých používaných délek



EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

Průtoková metoda je zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 5 a 6.

Medián letální koncentrace (LC_{50}): je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Hustota obsádky: počet ryb na jednotku objemu vody.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

WPF: týdny po fertilizaci.

Dodatek 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l

Dodatek 3

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU MEOGRT

1. Doporučený druh	Halančík japonský (*Oryzias latipes*)
2. Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3. Teplota vody	Nominální teplota při zkoušce je 25 °C. Střední teplota po celou dobu zkoušky v každé nádrži je 24–26 °C.
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální a ~ 150 lumen/m^2) (~ 150 lux).
5. Fotoperioda	16 h světlo: 8 h tma
6. Velikost násady	F0: 2 dospělé ryby/replikát; F1: zahajuje se maximálně s 20 vajíčky (embryi)/ replikát, redukuje se na 12 embryí/replikát při vylíhnutí a poté 2 dospělé ryby (chovný pár XX-XY) v týdnu 9–10 pro reprodukční fázi
7. Minimální využitelný objem zkušební komory	1,8 l (např. velikost zkušební komory: 18 x 9 x 15 cm)
8. Výměna objemu zkušebních roztoků	Minimálně 5násobek objemu/den a maximálně 16násobek objemu/den (nebo průtok 20 ml/min)
9. Stáří zkušebních organismů při zahájení	F0: > 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci
10. Počet organismů na replikát	F0: 2 ryby (pár samička a sameček); F1: maximálně 20 ryb (vajíček)/replikát (vyprodukovaných chovnými páry z generace F0 a F1).
11. Počet expozic	5 expozic zkoušené chemické látce plus příslušná kontrola (kontroly)
12. Počet replikátů pro každou expozici	Minimálně 6 replikátů na expozici u zkoušené chemické látky a minimálně 12 replikátů u kontrol a u kontroly s rozpouštědlem, pokud je použita (počet replikátů se v reprodukční fázi u generace F1 zdvojnásobí)
13. Počet organismů na zkoušku	Minimálně 84 ryb v generaci F0 a 504 v generaci F1. (Je-li použita kontrola s rozpouštědlem, pak 108 ryb v generaci F0 a 648 ryb v generaci F1.) Počítanou jednotkou je post-eleutheroembryo.
14. Krmný režim	Ryby se krmí libovolně dlouho žábronožkou, rod *Artemia,* (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. (Příklad krmného plánu pro zajištění adekvátního růstu a vývoje na podporu silné reprodukce lze nalézt v dodatku 5.)
15. Provzdušňování	Žádné, pokud rozpuštěný kyslík neklesne pod 60 % hodnoty saturace vzduchu.
16. Ředicí voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda.

17. Doba expozice	Primárně 19 týdnů (od generace F0 do vylíhnutí generace F2)
18. Biologické ukazatele (primární)	Líhnivost (F1 a F2); přežití (F1, od vylíhnutí do týdne 4 po fertilizaci (konec larválního stádia / začátek stádia mladých ryb), od týdne 4 do týdne 9 (nebo 10) po fertilizaci (začátek stádia mladých ryb do stádia nedospělých ryb) a od týdne 9 do týdne 15 po fertilizaci (nedospělé ryby až do ukončení zkoušky u dospělých ryb)); růst (F1, délka a hmotnost v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); druhotné pohlavní znaky (F1, papily na řitní ploutvi v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); vitelogenin (F1, mRNA *vtg* nebo bílkovina VTG v týdnu 15 po fertilizaci); fenotypové pohlaví (F1, prostřednictvím histologického vyšetření gonád v týdnu 15 po fertilizaci); rozmnožování (F0 a F1, plodivost a fertilita po dobu 21 dnů); doba do vytření (F1) a histopatologie (F1, gonády, játra a ledviny v týdnu 15 po fertilizaci)
19. Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík ≥ 60 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody 24–26 °C po celou dobu zkoušky; úspěšná reprodukce ≥ 65 % samiček v kontrolní skupině (skupinách); střední denní plodivost ≥ 20 vajíček v kontrolní skupině (skupinách); líhnivost vajíček ≥ 80 % (průměr) v kontrolních skupinách (v každé generaci F1 a F2); přežití po vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci ≥ 80 % (průměr) a od týdne 3 po fertilizaci až do ukončení pro tuto generaci ≥ 90 % (průměr) v kontrolních skupinách (F1), koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku by měly být uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % středních naměřených hodnot.

Dodatek 4

POKYNY K TYPICKÝM KONTROLNÍM HODNOTÁM

Je třeba uvést, že tyto kontrolní hodnoty vycházejí z omezeného počtu validačních studií a s ohledem na další zkušenosti mohou být revidovány.

Růst

Hmotnost a délka se měří u všech vzorků ryb v týdnu 9 (nebo 10) a 15 po fertilizaci. Při dodržování tohoto protokolu bude očekávaná hmotnost za vlhka v týdnu 9 po fertilizaci 85–145 mg u samečků a 95–150 mg u samiček. Očekávaná hmotnost v týdnu 15 po fertilizaci je 250–330 mg u samečků a 280–350 mg u samiček. I když se u jednotlivých ryb mohou objevit značné odchylky od těchto rozmezí, střední kontrolní hmotnosti výrazně mimo uvedené rozmezí, zejména nižší, naznačují problémy s krmením, řízením teploty, kvalitou vody, nemocemi nebo kombinaci těchto faktorů.

Líhnutí

Úspěšnost líhnutí v kontrolních skupinách je obvykle kolem 90 %, ale ani tak nízké hodnoty, jako je 80 %, nejsou neobvyklé. Úspěšnost líhnutí menší než 75 % může ukazovat na nedostatečné míchání vyvíjejících se vajíček nebo neadekvátní péči o vajíčka, například odumřelá vajíčka nebyla včas odstraňována, což vedlo k napadení houbami.

Přežití

Míra přežití od vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci a po týdnu 3 po fertilizaci je u kontrolních skupin obvykle 90 % nebo více, ale ani tak nízká míra přežití v raných vývojových stádiích, jako je 80 %, není alarmující. Míra přežití v kontrolních skupinách menší než 80 % by měla vzbuzovat obavy a může naznačovat nedostatečné čištění akvária vedoucí k úhynu rybích larev z důvodu nemocí nebo udušení v důsledku nízkých hladin rozpuštěného kyslíku. Mortalita může být rovněž důsledkem poranění při čištění nádrže a ztráty rybích larev vypuštěním do odtoku z nádrže.

Gen Vitelogenin

I když se absolutní hladiny genu *vitelogenin* (*vtg*), vyjádřené jako kopie celkové mRNA, mezi jednotlivými laboratořemi mohou značně lišit v důsledku používaných postupů nebo nástrojů, měl by být poměr *vtg* přibližně 200krát větší u kontrolních samiček než u kontrolních samečků. Není neobvyklé, aby byl tento poměr vysoký i 1 000 až 2 000, avšak poměry menší než 200 jsou podezřelé a mohou naznačovat problémy s kontaminací vzorku nebo problémy s použitým postupem anebo reagenciemi.

Druhotné Pohlavní Znaky

U samečků je normální rozsah druhotných pohlavních znaků, definovaný jako celkový počet segmentů ploutevních paprsků papil na řitní ploutvi, 40–80 segmentů v týdnu 9–10 po fertilizaci. Do týdne 15 po fertilizaci by měl být rozsah u kontrolních samečků přibližně 80–120 a 0 u kontrolních samiček. Ve vzácných případech nemají někteří samečci z nevysvětlitelných důvodů do týdne 9 po fertilizaci žádné papily, ale protože do týdne 15 po fertilizaci se papily vyvinou u všech kontrolních samečků, je to s největší pravděpodobností způsobeno opožděným vývojem. Přítomnost papil u kontrolních samiček ukazuje přítomnost samečků XX v populaci.

Samečci XX

Zdá se, že normální výskyt samečků XX v chovu je přibližně 4 % nebo méně při 25 °C, přičemž výskyt se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Je třeba učinit opatření na minimalizaci podílu samečků XX v populaci. Protože se zdá, že výskyt samečků XX má genetickou složku a je tedy dědičný, je efektivním způsobem jak snížit výskyt samečků XX v populaci monitorování chovné zásoby a zajištění, aby samečci XX nebyli používáni na rozmnožování chovné zásoby.

Tření

Před posouzením plodivosti by mělo být u kontrolních replikátů denně monitorováno tření. Kontrolní páry mohou být kvalitativně posuzovány vizuálně, zda jeví známky tření. Do týdne 12–14 po fertilizaci by se měla většina kontrolních párů vytřít. Nízké počty párů, které se do této doby vytřely, ukazují na potenciální problémy se zdravotním stavem, vyspělostí nebo dobrými podmínkami ryb.

Plodivost

Zdravý, dobře živený halančík japonský se do týdne 12–14 po fertilizaci obvykle tře denně, přičemž každý den vyprodukuje 15 až 50 vajíček. 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů (> 65 %) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně, ale může to být i 40 vajíček denně. Méně vajíček, než je uvedené množství, může ukazovat, že páry jsou nezralé, podvyživené nebo nezdravé.

Fertilita

Procento fertilních vajíček pro kontrolní páry je obvykle v rozsahu 90 %, přičemž hodnoty pohybující se kolem 95 % nebo více nejsou neobvyklé. Míry fertility menší než 80 % u kontrolních vajíček jsou podezřelé a mohou ukazovat na nezdravé jedince nebo horší než ideální podmínky chovu.

Dodatek 5

PŘÍKLAD KRMNÉHO PLÁNU

Příklad krmného plánu, který zajišťuje adekvátní růst a vývoj na podporu robustní reprodukce, je uveden v tabulce 1. Lze připustit odchylky od tohoto krmného plánu, ale doporučuje se, aby byly otestovány za účelem ověření, že bude pozorován přijatelný růst a reprodukce. Aby byl dodržen navrhovaný krmný plán, je třeba před zahájením zkoušky stanovit hmotnost sušiny žábronožky v objemu žábronožky ve formě kaše. Lze to provést zvážením definovaného objemu kaše žábronožky, která byla vysušována po dobu 24 hodin při 60 °C na předem zvážených miskách. Za účelem zohlednění hmotnosti solí v kaši je třeba vysušit stejný objem stejného solného roztoku použitého v kaši, zvážit jej a odečíst od hmotnosti vysušené kaše žábronožky. Alternativně je možné žábronožku před vysušením přefiltrovat a propláchnout destilovanou vodou, čímž se eliminuje nutnost stanovit hmotnost „solného slepého roztoku“. Tyto informace slouží k přepočtu údajů z tabulky o hmotnosti sušiny žábronožky na objem žábronožky ve formě kaše, který má být zkrmen na jednu rybu. Kromě toho se doporučuje každý týden zvážit poměrný podíl kaše žábronožky, a ověřit tak správnou hmotnost zkrmované sušiny.

Tabulka 1

Příklad krmného plánu

Čas (po vylíhnutí)	Žábronožka (hmotnost sušiny v mg/ryba/den)
Den 1	0,5
Den 2	0,5
Den 3	0,6
Den 4	0,7
Den 5	0,8
Den 6	1,0
Den 7	1,3
Den 8	1,7
Den 9	2,2
Den 10	2,8
Den 11	3,5
Den 12	4,2
Den 13	4,5

Čas (po vylíhnutí)	Žábronožka (hmotnost sušiny v mg/ryba/den)
Den 14	4,8
Den 15	5,2
Dny 16–21	5,6
Týden 4	7,7
Týden 5	9,0
Týden 6	11,0
Týden 7	13,5
Týden 8–utracení	22,5

Dodatek 6

PŘÍKLADY INKUBAČNÍ KOMORY NA VAJÍČKA

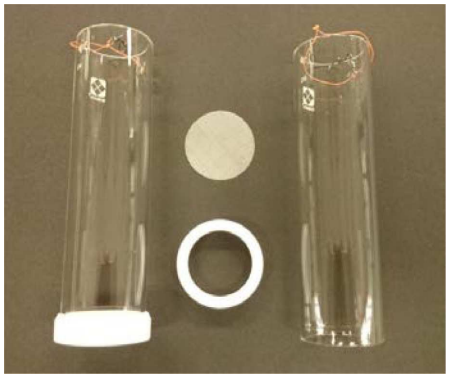
Příklad A





Tento inkubátor se skládá z příčně dělené skleněné odstředivky, která je připojena objímkou z korozivzdorné oceli a uchycena šroubovací zátkou. Skrz zátku prochází úzká skleněná trubička nebo trubička z korozivzdorné oceli a vede až k zaoblenému dnu, kam přivádí vzduch, který lehce probublává a víří vajíčka, čímž se snižuje přenos saprofytických plísňových infekcí mezi vajíčky a zároveň usnadňuje výměna chemické látky mezi inkubátorem a chovnou nádrží.

Příklad B





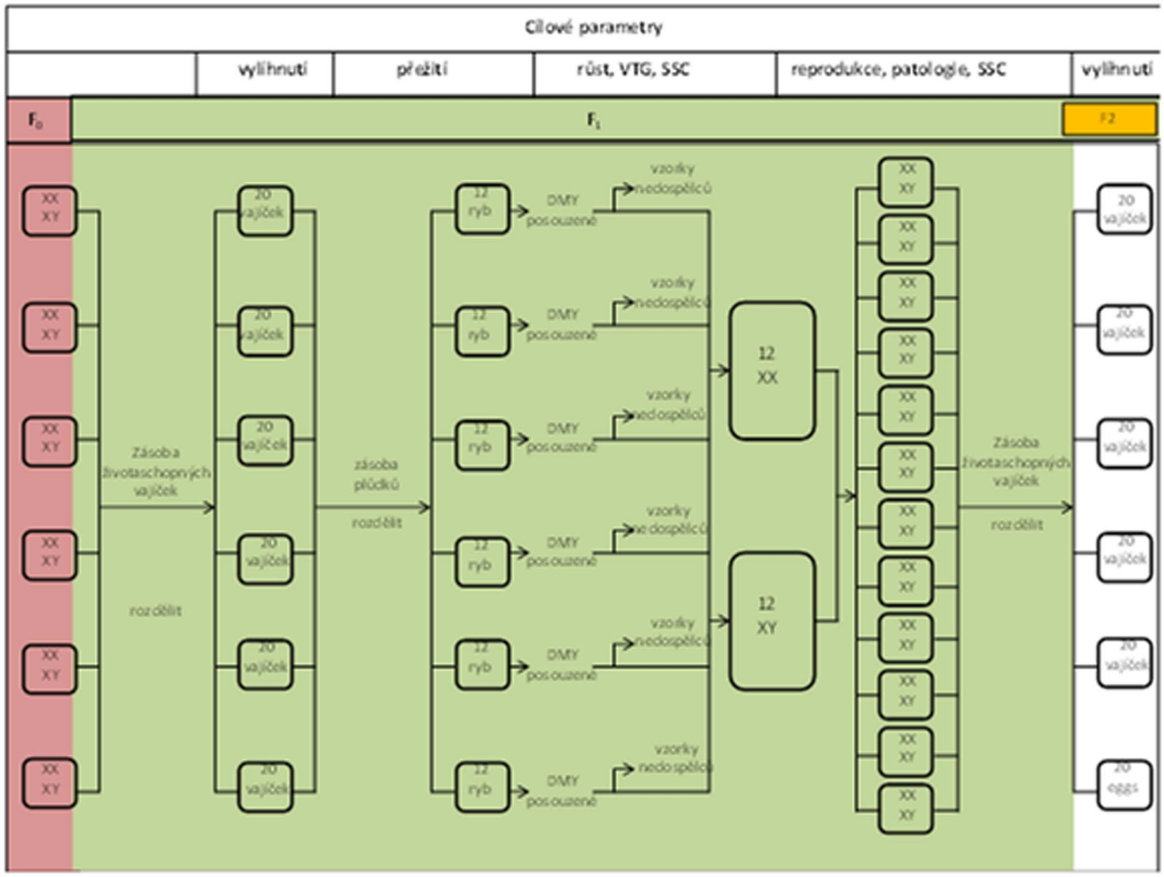
Tento inkubátor se skládá ze skleněného válcovitého tělesa (průměr 5 cm a výška 10 cm) a sítě z korozivzdorného ocelového drátu (oko 0,25 φ a 32), které je připevněno ke dnu tělesa kroužkem z PTFE. Inkubátory jsou zavěšeny v nádržích na tyči a vertikálně protřepávány (v amplitudě přibližně 5 cm) v cyklu (přibližně jednou za 4 sekundy) vhodném pro vajíčka halančíka japonského.

Dodatek 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM PRO SLUČOVÁNÍ A OSAZOVÁNÍ REPLIKÁTŮ V PRŮBĚHU ZKUŠEBNÍ METODY MEOGRT

Obrázek 1

Slučování a osazování replikátů v průběhu zkušební metody MEOGRT Obrázek představuje jednu expozici nebo polovinu kontroly. Vzhledem ke slučování není v průběhu zkoušky identita replikátu kontinuální. Upozorňujeme, že výraz „vajíčka“ se týká životaschopných, oplodněných vajíček (ekvivalent embryí).



Expozice A Replikace

Zkušební metoda doporučuje pět expozic zkoušené chemické látce s použitím technického materiálu a negativní kontroly. Počet replikátů v jedné expozici není v průběhu zkoušky MEOGRT konstantní, počet replikátů v kontrolní expozici je dvojnásobek expozice každé jednotlivé zkoušené chemické látce. V generaci F0 má každá expozice zkoušené chemické látce šest replikátů, zatímco expozice negativní kontrole má 12 replikátů. Důrazně se nedoporučuje používat rozpouštědla, a pokud jsou přesto použita, je třeba do zprávy o zkoušce MEOGRT uvést vybrané rozpouštědlo a odůvodnění pro jeho použití. Je-li použito rozpouštědlo, je také třeba provést dva druhy kontroly: a) kontrolu s rozpouštědlem a b) negativní kontrolu. Každá z těchto dvou kontrolních skupin by měla zahrnovat celou škálu replikátů ve všech bodech časového průběhu zkoušky MEOGRT. Tato struktura replikátů zůstává stejná po celou dobu vývoje zkušebních organismů v generaci F1 (a v generaci F2, do vylíhnutí). Ve stádiu dospělosti, když jsou sestavovány chovné páry generace F1, se však počet replikátů reprodukčních párů na jednu expozici optimálně zdvojnásobí; proto je v každé expozici zkoušené chemické látce až 12 replikovaných párů a v kontrolní skupině 24 replikovaných párů (a dalších 24 replikovaných párů v kontrole s rozpouštědlem, je-li potřebná). Určení líhnutí z embryí vyprodukovaných páry generace F1 se provádí na stejné struktuře replikátů jako u embryí vyprodukovaných páry z generace F0, což znamená zpočátku šest replikátů na jednu expozici zkoušené chemické látce a 12 replikátů v kontrolní skupině (skupinách).

Dodatek 8

POČÍTÁNÍ PAPIL NA ŘITNÍ PLOUTVI

Hlavní Materiál A Reakční Činidla

— Stereoskopický mikroskop (volitelně s připojenou kamerou)

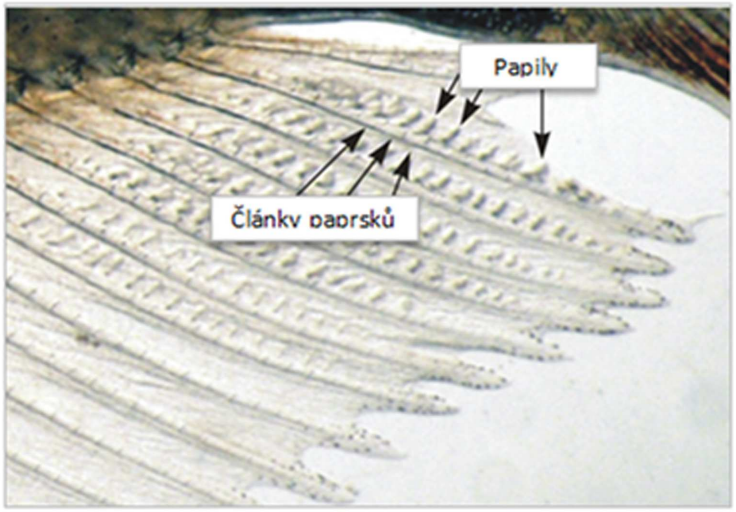
— Fixační roztok (např. Davidsonův (Bouinův se nedoporučuje)), pokud se nepočítá přímo ze zobrazení

Postupy

Po pitvě se řitní ploutev zobrazí, aby bylo možné pohodlně spočítat papily na řitní ploutvi. I když je zobrazení doporučenou metodou, lze řitní ploutev zafixovat pomocí Davidsonova fixačního roztoku nebo jiné vhodné fixační látky aplikované přibližně na 1 minutu. Je důležité udržet při fixaci řitní ploutev plochou, aby bylo možné snáze spočítat papily na řitní ploutvi. Mrtvé tělo s řitní ploutví lze do analýzy uchovat v Davidsonově fixačním roztoku nebo v jiné vhodné fixační látce. Spočítejte počet článků paprsků (viz **obrázek 1**) s papilami, které vystupují ze zadního okraje článku paprsků.

Obrázek 1

Papily na řitní ploutvi



Dodatek 9

PODROBNÝ ČASOVÝ PLÁN ZKOUŠKY MEOGRT

Zkušební Týdny 1–-3 (F0)

Ryby ve tření z generace F0, které splnily kritéria výběru (viz odstavce 16–20), se exponují na tři týdny, aby se umožnil vývoj gamet a gonadálních tkání, jež mají být exponovány zkoušené chemické látce. V každé replikované nádrži se chová jeden chovný rybí pár (chovný pár samička XX – sameček XY). Počínaje prvním dnem zkoušky se po dobu 21 po sobě jdoucích dnů sbírají vytřená vajíčka, spočítají se a vyhodnotí se jejich fertilita.

Zkušební Týden 4 (F0 A F1)

Vhodnější je sesbírat oplodněná a životaschopná vajíčka (embrya) v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Každý den se kontroluje a zaznamenává mortalita oplodněných vajíček (embryí). Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (odumřelá vajíčka se vyznačují zejména v raných stadiích zřetelnou ztrátou průsvitnosti a změnou ve zbarvení vyvolanou koagulací a/nebo sražením bílkovin, což vede k bílému zakalení; OECD (2010).

Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor. Dále lze v generaci F0 přidat více chovných párů na každou expoziční a kontrolní skupinu, aby vyprodukovaly více vajíček, a mohl tak být dosažen doporučený počet 20 vajíček na replikát.

V den zkoušky 24 se chovné páry z generace F0 humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F0 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F1.

Zkušební Týdny 5–6 (F1)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Embrya vylíhlá v jednotlivé dny se sloučí podle expoziční skupiny a systematicky rozdělí do každé nádrže pro rybí larvy v rámci dané expoziční skupiny, přičemž do jedné nádrže se umístí maximálně 12 plůdků. Provádí se to náhodným výběrem plůdků a jejich umístěním po jednom postupně do replikátů bez rozlišení, přičemž se postupuje v pořadí konkrétních expozičních replikátů, dokud všechny replikáty v rámci expoziční skupiny nemají 12 plůdků. Pokud není dostatek plůdků k zaplnění všech replikátů, zajistěte, aby co možná nejvíce replikátů mělo 12 plůdků a mohla být zahájena fáze F1.

Vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná a zlikvidují se. Počet plůdků se zaznamená a v každém replikátu se vypočítá úspěšnost líhnutí (líhnivost).

Zkušební Týden 7–11 (F1)

Ve všech replikátech se každý den kontroluje a zaznamenává přežití rybích larev. V den zkoušky 43 se zaznamená počet přeživších ryb v každém replikátu, jakož i počáteční počet plůdků umístěných do daného replikátu (nominálně 12). Umožňuje to vypočítat procento přežití od vylíhnutí do stádia nedospělosti.

Zkušební Týden 12 (F1)

Ve dnech zkoušky 78–85 se z ocasní ploutve každé ryby odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (tj. vystřižení ploutve). Tyto informace se použijí k sestavení chovných párů.

Do tří dnů po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně sestaví 12 chovných párů na každou expoziční skupinu a 24 párů na každou kontrolu. Z každého replikátu se náhodně vyberou dvě ryby XX a XY, poté se sloučí podle pohlaví a pak náhodně vyberou za účelem sestavení chovného páru (tj. pár XX-XY). Sestaví se minimálně 12 replikátů na každou expozici chemické látce a minimálně 24 replikátů na každou kontrolu s jedním chovným párem v každém replikátu. Pokud v replikátu nejsou k dispozici dvě ryby XX, případně dvě ryby XY ke sloučení, použije se ryba s příslušným genotypem pohlaví z jiných replikátů v rámci expoziční skupiny.

Zbývající ryby (maximálně 8 ryb na replikát) se humánně usmrtí a odeberou se vzorky pro různé sledované parametry nedospělého stádia. Údaje o *dmy* (XX nebo XY) ze všech vzorků nedospělého stádia se uchovají, aby bylo zajištěno, že všechna data sledovaných parametrů mohou být vztažena ke genetickému pohlaví každé jednotlivé ryby.

Zkušební Týdny 13–14 (F1)

Expozice pokračuje po dobu, kdy se nedospělé chovné páry vyvíjejí na dospělé jedince. V den zkoušky 98 (tj. den před zahájením sběru vajíček) se z akvárií i od samiček odstraní vajíčka.

Zkušební Týdny 15–17 (F1)

Vyprodukovaná vajíčka se v každém replikátu denně sbírají po dobu 21 po sobě jdoucích dnů a vyhodnotí se jejich plodivost a fertilita.

Zkušební Týden 184 (Opakování Zkušebního Týdne 4) (F1 A F2)

Ráno v den zkoušky 120 se v každé replikované nádrži provede sběr vajíček. Sesbíraná vajíčka se vyhodnotí a oplodněná vajíčka (s odstraněnými vlákny) od každého z chovných párů se sloučí podle expozice a systematicky rozdělí do inkubačních komor po 20 oplodněných vajíčkách na inkubátor. Inkubátory mohou být umístěny do samostatných „inkubačních nádrží" vytvořených pro každou expozici nebo do replikované nádrže, která bude po vylíhnutí obsahovat larvy. Vhodnější je sesbírat embrya v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor.

V den zkoušky 121 (nebo v den zkoušky 122, aby bylo zajištěno dobré zahájení generace F2) se chovné páry z generace F1 humánně usmrtí a analyzují se sledované parametry dospělých jedinců. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F1 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F2.

Zkušební Týden 19–20 (F2)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Jestliže je zkouška ukončena do dokončení líhnutí generace F2, jsou plůdky každý den spočítány a zlikvidovány. (Embrya, z nichž se nevylíhl plůdek ani po prodloužené inkubační době definované jako dvojnásobek střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná.)

Dodatek 10

STATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajů vznikajících ve zkoušce MEOGRT nejsou jedinečné jen pro tuto zkoušku a bylo vyvinuto mnoho vhodných statistických metodik pro správnou analýzu podobných dat, s výjimkou patologických údajů, v závislosti na jejich charakteristikách, včetně normality, homogenity rozptylu, na tom, zda plán studie sám o sobě vede k testování hypotézy, nebo k regresní analýze, zda jde o parametrické nebo neparametrické testy atd. V zásadě platí, že navržené statistické analýzy dodržují doporučení OECD pro údaje o ekotoxicitě (OECD 2006), schéma rozhodování pro analýzu údajů ze zkoušky MEOGRT je uvedeno na obrázku 2.

Lze předpokládat, že soubory dat budou nejčastěji zobrazovat monotónní odpovědi. Dále je třeba vzít v úvahu problém použití jednostranného statistického testu proti oboustrannému statistickému testu. Pokud neexistuje biologické zdůvodnění, že jednostranný test je nevhodný, doporučuje se používat jednostranné testy. I když jsou v následující části doporučeny určité statistické testy, pokud jsou vyvinuty vhodnější anebo silnější statistické metody pro použití u specifických údajů vzniklých při zkoušce MEOGRT, použijí se tyto statistické testy, aby byly maximálně využity uvedené výhody.

Údaje ze zkoušky MEOGRT se analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Existují dvě strategie analyzování údajů od ryb s opačným pohlavím (samečků XX nebo samiček XY). 1) Cenzurovat všechny údaje od ryb s opačným pohlavím v celé zkoušce s výjimkou prevalence změny pohlaví v každém replikátu. 2) Ponechat údaje od všech ryb s opačným pohlavím v souboru dat a analyzovat je podle genotypu.

Histopatologické Údaje

Histopatologické údaje se uvádějí jako stupně závažnosti, které se hodnotí pomocí nově vyvinutého statistického postupu, Rao-Scottova, Cochran-Armitagova testu využívajícího dílčí testy (RSCABS), (Green *et al*., 2014). Úprava podle *Rao-Scotta* ponechává informace z replikací zkoušky; postup *využívající dílčí testy* zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice. U každé diagnózy specifikuje výstup RSCABS, u kterých expozičních skupin byla prevalence patologie vyšší než u kontrol, a s tím související úroveň závažnosti.

Údaje O Plodivosti

Analýzy pro údaje o plodivosti zahrnují sestupný Jonckheerův-Terpstrův nebo Williamsův test na stanovení účinků expozice za předpokladu, že data jsou konzistentní a mají monotónní odpověď na koncentraci. U sestupného testu se všechna porovnání provádějí na hladině významnosti 0,05 a bez korekce počtu provedených porovnání. Očekává se, že údaje budou odpovídat monotónní odpovědi na koncentraci, ale lze to ověřit buď vizuální prohlídkou dat, nebo sestavením lineárních a kvadratických kontrastů středních hodnot expozice po transformaci dat seřazených do pořadí. S výjimkou případů, kdy je kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, provádí se trend-test. Jinak se používá Dunnettův test na stanovení účinku expozice, pokud jsou data normálně distribuovaná s homogenními rozptyly. Jestliže tyto požadavky nejsou splněny, pak se použije Dunnův test s úpravou podle Bonferonniho-Holma. Všechny uvedené testy se provádějí nezávisle na případném celkovém F-testu nebo Kruskalově-Wallisově testu. Další podrobnosti jsou uvedeny v dokumentu OECD 2006.

Pro počítání vajíček (bez transformace) lze použít alternativní metody, jako je generalizovaný lineární model s Poissonovým rozdělením chyb, jestliže je to statisticky odůvodněno (Cameron and Trividi, 2013). Při použití alternativního přístupu se doporučuje vyžádat si radu od statistiků.

Denní Počítání Vajíček U Jedné Generace

Model ANOVA je dán vztahem Y= čas*čas + expozice + *expozice + čas*expozice + *čas*expozice, s náhodnými účinky replikátu (generace*expozice), a čas*replikát (expozice), což umožňuje nerovné složky rozptylu obou typů napříč generacemi. Čas zde znamená frekvenci počítání vajíček (např. denně nebo týdně). Jde o analýzu opakovaného měření s korelacemi mezi pozorováními stejného replikátu při zohlednění skutečnosti, že data jsou měřena opakovaně.

Hlavní účinky expozice se testují pomocí Dunnettova (nebo Dunnettova-Hsuova) testu, který zahrnuje korekci podle počtu srovnání. Korekce hlavního účinku u generace nebo času jsou nutné, neboť u těchto dvou faktorů není žádná „kontrolní“ úroveň a každý pár úrovní může představovat srovnání, které je předmětem zájmu. Jestliže je u těchto dvou hlavních účinků F-test hlavního účinku signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání tohoto faktoru mezi úrovněmi testována na úrovni 0,05 bez další úpravy.

Model zahrnuje interakce dvou a tří faktorů, takže hlavní účinek například u času nemusí být signifikantní, i když má čas signifikantní dopad na výsledky. Jestliže je tedy interakce dvou nebo tří faktorů zahrnujících čas signifikantní na úrovni 0,05, lze akceptovat srovnání úrovní času na úrovni signifikance 0,05 bez další úpravy.

Další jsou F-testy signifikance expozice v čase, tzv. dílčí testy v tabulce ANOVA. Jestliže je například dílčí test expozice v generaci F1 a čase 12 signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání expozice v generaci F1 a čase 12 akceptována na úrovni 0,05 bez další úpravy. Podobná tvrzení platí i pro testy času v generaci F1 a expozice a pro generaci v rámci určitého času a expozice.

Konečně, u srovnání nespadajících do žádné z výše uvedených kategorií je třeba srovnání upravit pomocí Bonferroniho-Holmovy korekce na p-hodnoty. Další informace o analýzách těchto modelů lze nalézt v publikaci Hockinga (1985) a Hochberga a Tamhana (1987).

Alternativně se nezpracovaná data zaznamenají a uvedou v závěrečné zprávě jako plodivost (počet vajíček) na replikát za každý den. Vypočítá se střední hodnota nezpracovaných dat replikátu a poté se použije transformace druhou odmocninou. Vypočítá se jednocestná analýza ANOVA z transformovaných středních hodnot replikátu a poté Dunnettovy kontrasty. Rovněž může být užitečné vizuálně zkontrolovat data o plodivosti u každé expozice anebo replikátu na bodovém grafu, který zobrazuje data v čase. Umožní to neformální posouzení potenciálních účinků v průběhu času.

Všechny Ostatní Biologické Údaje

Statistické analýzy vycházejí ze základního předpokladu, že při správné volbě dávky budou data monotónní. Data se tedy považují za monotónní a formálně se vyhodnotí jejich monotónnost pomocí lineárních a kvadratických kontrastů. Jsou-li data monotónní, doporučuje se Jonckheerův-Terpstrův trend-test mediánů replikátů (jak je doporučeno v dokumentu OECD 2006). Je-li kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, data se považují za nemonotónní.

Jestliže jsou data nemonotónní, zejména vzhledem k redukované odpovědi nejvyšší expozice nebo nejvyšších dvou expozic, je třeba zvážit cenzurování datového souboru, aby byla analýza provedena bez těchto expozic. Toto rozhodnutí je třeba učinit na základě odborného posouzení a všech dostupných dat, zejména dat, která naznačují zjevnou toxicitu na těchto úrovních expozice.

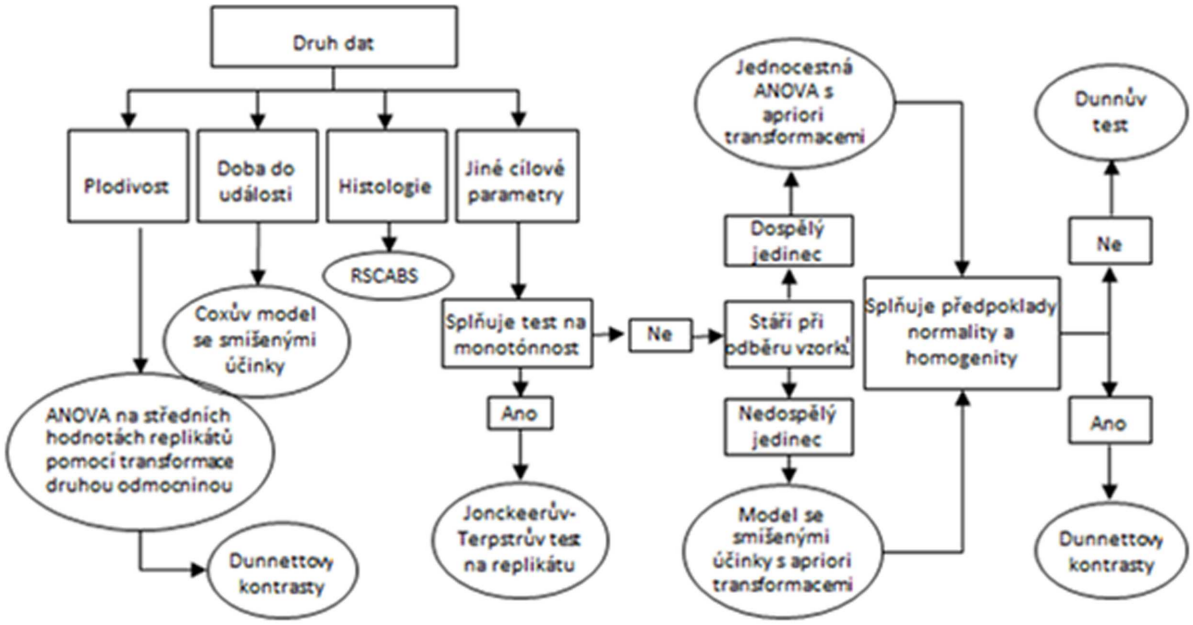
U hmotnosti a délky se nedoporučuje provádět žádné transformace, i když občas mohou být nutné. U údajů o vitelogeninu se však doporučuje logaritmická transformace; u údajů o SSC (papily na řitní ploutvi) se doporučuje transformace druhou odmocninou; u údajů o líhnivosti, procentu přežití, podílu pohlaví a procentu fertilních vajíček se doporučuje transformace druhou odmocninou funkce arcsin. Doba do vylíhnutí a doba do prvního vytření se považuje za údaj o vztahu mezi časem a událostí, přičemž jednotlivá embrya, která se nevylíhnou v definovaném časovém období, nebo replikáty, které se nevytřou, se považují za vpravo cenzurovaná data. Doba do vylíhnutí se počítá od mediánového dne vylíhnutí každého replikátu. Tyto cílové parametry se analyzují pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků.

Biologická data ze vzorků dospělých ryb mají jedno měření na replikát, to znamená, že v každém replikovaném akváriu je jedna ryba XX a jedna ryba XY. Proto se doporučuje provést jednocestnou analýzu ANOVA středních hodnot replikátu. Jsou-li splněny předpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu posuzovaná podle reziduálních hodnot z analýzy ANOVA pomocí Shapirova-Wilksova testu, respektive Levenova testu), použijí se Dunnettovy kontrasty na stanovení expozic, které se lišily od kontroly. Naopak, jestliže předpoklady analýzy ANOVA nejsou splněny, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly. Podobný postup se doporučuje i pro data, která jsou ve formě procent (fertilita, líhnutí a přežití).

Biologická data ze vzorků nedospělých ryb mají od 1 do 8 měření na replikát, to znamená, že počty jednotlivců, kteří přispívají ke střední hodnotě replikátu u každého genotypového pohlaví, mohou být různé. Proto se doporučuje použít model ANOVA se smíšenými účinky a poté Dunnettovy kontrasty, pokud byly splněny předpoklady normality a homogenity rozptylu (na reziduální hodnoty smíšených účinků analýzy ANOVA). Jestliže splněny nebyly, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly.

Obrázek 2

Vývojový diagram pro doporučené statistické postupy pro analýzu dat MEOGRT.



LITERATURA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (přílohy k této publikaci jsou ve formě samostatného dokumentu), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 **ANALÝZA RŮSTU A VÝVOJE LAREV OBOJŽIVELNÍKŮ (LAGDA)**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení č. 241 (2015). Potřeba vyvinout a ověřit zkoušku schopnou zjistit a charakterizovat nežádoucí důsledky expozice toxickým chemickým látkám u obojživelníků vyplývá z obavy, že úrovně chemických látek v životním prostředí mohou mít nepříznivé účinky na lidi i volně žijící živočichy. Pokyn OECD týkající se analýzy růstu a vývoje larev obojživelníku (LAGDA) popisuje zkoušku toxicity na obojživelnících, při níž je posuzován růst a vývoj od fertilizace po dobu raného juvenilního období. Jde o analýzu (obvykle 16 týdnů), která hodnotí raný vývoj, metamorfózu, přežití, růst a částečné reprodukční dospívání. Umožňuje také měřit sadu dalších cílových parametrů za účelem diagnostického hodnocení pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC) nebo jiných druhů vývojových a reprodukčních toxických látek. Metoda popsaná v této zkušební metodě je odvozena od validační práce na drápatce vodní (*Xenopus laevis*) provedené americkou Agenturou pro ochranu životního prostředí (U.S. EPA) s podporou z Japonska (1). I když mohou být na růstový a vývojový zkušební protokol adaptovány jiné druhy obojživelníků, přičemž důležitou složkou je schopnost určit genetické pohlaví, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka *Xenopus laevis*.

2. Analýza LAGDA slouží jako zkouška vyššího stupně u obojživelníků pro sběr složitějších informací o nežádoucích účincích na základě vztahu mezi koncentrací a odpovědí a je vhodná pro použití při identifikaci a charakterizaci nebezpečnosti a posuzování ekologických rizik. Analýza je na úrovni 4 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů, kde analýzy *in vivo* poskytují také údaje o nežádoucích účincích na sledované parametry související s endokrinním systémem (2). Obecné uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu 8–10 (3) podle Nieuwkoopa a Fabera (NF) minimálně čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (obvykle minimálně v polovičních logaritmických intervalech) a kontrole (kontrolám) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62 (≤ 45 po fertilizaci; obvykle přibližně 45 dnů (dpf). V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice (při odebírání průběžného dílčího vzorku a konečného vzorku po dokončení zkoušky) zahrnují parametry indikující generalizovanou toxicitu: mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou. Tato metoda klade primární důraz na potenciální účinky relevantní pro populaci (a to nežádoucí dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukční vývoj) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace působící x% změnu (EC_x) měřeného cílového parametru. Je však třeba poznamenat, že přístupy EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto druhu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkoušených koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x. Rovněž je třeba poznamenat, že tato metoda nezahrnuje reprodukční fázi samotnou. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy, a zejména proto, že mezilaboratorní reprodukovatelnost není doposud zadokumentována s experimentálními daty, lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude pokyn OECD 241 přezkoumán a v případě potřeby revidován z hlediska nabytých zkušeností. Analýza LAGDA je důležitá analýza řešící potenciální faktory přispívající k poklesu populace obojživelníků hodnocením účinků expozice chemickým látkám v průběhu citlivého larválního stádia, kdy mohou účinky na přežití a vývoj, včetně normálního vývoje reprodukčních orgánů, negativně ovlivnit populace.

4. Zkouška je navržena tak, aby detekovala hlavní účinek (účinky) vyplývající z endokrinních i neendokrinních mechanismů, a zahrnuje diagnostické cílové parametry, které jsou z části specifické pro klíčové endokrinní dráhy. Je třeba uvést, že dokud nebyla vyvinuta analýza LAGDA, neexistovala žádná validovaná analýza, která by sloužila pro tuto funkci u obojživelníků.

5. Před zahájením analýzy je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky. Po dobu přibližně 16 týdnů vyžaduje tato analýza celkový počet 480 zvířat, tj. embryí *X. laevis* (nebo 640 embryí, jestliže je použita kontrola s rozpouštědlem), aby byla zajištěna dostatečná síla zkoušky pro hodnocení cílových parametrů relevantních pro populaci, jako je růst, vývoj a reprodukční dospělost.

6. Před použitím zkušební metody ke zkoušení směsi pro účely právních předpisů je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel. Kromě toho tato analýza nehodnotí plodivost přímo, takže nemusí být použitelná v pokročilejším stádiu, než je úroveň 4 Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz.

VĚDECKÝ ZÁKLAD ZKUŠEBNÍ METODY

7. Většina našich současných znalostí o biologii obojživelníků byla získána pomocí modelového laboratorního druhu *X. laevis*. Tento druh může být rutinně chován v laboratoři, ovulaci lze indukovat pomocí lidského choriového gonadotropinu (hCG), přičemž zásoba zvířaty je běžně dostupná u komerčních chovatelů.

8. Stejně jako u všech obratlovců je reprodukce obojživelníků řízená hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osou (4). Mediátory tohoto endokrinního systému jsou estrogeny a androgeny, které řídí vývoj a fyziologii pohlavně dimorfních tkání. Ve vývojovém cyklu obojživelníků jsou tři odlišné fáze, kdy je tato osa zvláště aktivní: 1) diferenciace gonád v průběhu larválního vývoje, 2) vývoj druhotných pohlavních znaků a vyzrálost gonád v průběhu juvenilní fáze a 3) funkční reprodukce dospělých jedinců. Každé z těchto tří vývojových oken může být náchylné na narušení endokrinního systému určitými chemickými látkami, jako jsou estrogeny a androgeny, což nakonec vede ke ztrátě reprodukční způsobilosti organismů.

9. Gonády se začínají vyvíjet ve stádiu NF 43, kdy se nejdříve vyvine bipotenciální genitální rýha. Diferenciace gonád začíná ve stádiu NF 52, kdy primordiální zárodečné buňky buď migrují do medulární tkáně (samečci), nebo zůstávají v kortikální oblasti (samičky) vyvíjejících se gonád (3). Poprvé bylo zjištěno, že je tento proces pohlavní diferenciace gonád náchylný na chemickou alteraci, u druhu *Xenopus* v 50. letech minulého století (5) (6). Při expozici pulců estradiolu v průběhu tohoto období diferenciace gonád dochází ke změně pohlaví samečků, kteří jsou pak po dosažení dospělosti plně funkčními samičkami (7) (8). Funkční změna pohlaví samiček na samečky je také možná a byla hlášena po implantaci tkáně varlat pulcům (9). Přestože však expozice inhibitoru aromatázy také působí

funkční změnu pohlaví u *X. tropicalis* (10), nebylo prokázáno, že by k tomu docházelo u *X. laevis*. V minulosti byly účinky toxických látek na diferenciaci gonád hodnoceny podle histologického vyšetření gonád při metamorfóze a změna pohlaví mohla být stanovena pouze analýzou podílů pohlaví. Donedávna neexistovaly žádné prostředky jak přímo určit genetické pohlaví druhu *Xenopus*. Nedávné stanovení markerů souvisejících s pohlavím u druhu *X. laevis* však umožňuje určit genetické pohlaví a přímo identifikovat zvířata se změněným pohlavím (11).

10. U samečků postupuje juvenilní vývoj se zvyšováním hladin testosteronu v krvi odpovídajícím vývoji druhotných pohlavních znaků, jakož i vývoji varlat. U samiček produkují vaječníky estradiol, což vyvolává vznik vitelogeninu (VTG) v plazmě, vitelogeninových oocytů ve vaječníku a vývoj vejcovodů (12). Vejcovody jsou samičí druhotné pohlavní znaky, které fungují při dozrávání oocytů v průběhu reprodukce. Na vnější stranu oocytů procházejících přes vejcovod se nabalí sliz, oocyty se poté shromažďují ve váčku a jsou připraveny k fertilizaci. Zdá se že vývoj vejcovodů je regulován estrogeny, neboť u *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* vývoj koreluje s hladinami estradiolu (12). Byl hlášen vývoj vejcovodů u samečků po expozici sloučeninám polychlorovaných bifenylů (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu NF 8–10 vodní cestou čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (látek) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62. I když je možné podávat vysoce hydrofobní chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je doposud málo zkušeností. V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro každou použitou kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice zahrnují parametry indikující generalizovanou toxicitu (tj. mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost)), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou (tj. histopatologie štítné žlázy, histopatologie gonád a gonadálního traktu, abnormální vývoj, plazmatický vitelogenin (doplňkově) a podíly genotypového/fenotypového pohlaví).

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

12. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být ≥ 40 % nasycení vzduchem,

— teplota vody by měla být v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 1,0 °C,

— hodnota pH zkušebního roztoku by měla být udržována mezi 6,5 a 8,5 a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 0,5,

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot,

— mortalita po dobu expozice by měla být ≤ 20 % v každém replikátu v kontrolách,

— životaschopnost potěru vybraného k zahájení studie ≥ 70 %,

— střední doba do stádia NF 62 kontrol by měla být ≤ 45 dnů,

— střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat 1,0 ± 0,2, respektive 11,5 ± 3 g.

13. I když nejde o kritérium platnosti, doporučuje se, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty. Příliš vysoká mortalita, která zpochybňuje platnost expozice, je definována jako > 4 úhyny (> 20 %) ve 2 nebo více replikátech, které nelze vysvětlit technickou chybou. Pro analýzu musí být dostupné alespoň tři úrovně expozice bez zjevné toxicity. Známky zjevné toxicity mohou zahrnovat zejména plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět, morfologické abnormality (např. deformity končetin), hemoragické léze a abdominální edém.

14. V případě, že zjištěno nedodržení kritérií přijatelnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti zkušebních údajů a tyto úvahy by měly být zahrnuty do zpráv.

POPIS METOD

Přístroje a pomůcky

15. Normální laboratorní vybavení, a zejména:

a) zařízení řídící teplotu (např. ohřívače nebo chladiče nastavitelné na 21 ^{o} ± 1 ^{o}C);

b) teploměr;

c) binokulární stereoskopický mikroskop a preparační nástroje;

d) digitální fotoaparát s rozlišením minimálně 4 megapixelů a s mikrofunkcí (v případě potřeby);

e) analytické váhy s přesností měření na 0,001 mg nebo 1 μg;

f) oximetr (měřič rozpuštěného kyslíku) a pH-metr;

g) luxmetr (měřič intenzity osvětlení) s přesností měření na jednotky luxů.

Voda

Zdroje a kvalita

16. Použít lze jakoukoli ředicí vodu, která je místně dostupná (např. pramenitou vodu nebo vodu z kohoutku filtrovanou přes aktivní uhlí) a umožňuje normální růst a vývoj *X. laevis*, přičemž by měly být k dispozici důkazy o normálním růstu v této vodě. Jelikož kvalita místní vody se může v různých oblastech podstatně lišit, je třeba provést analýzu kvality vody, zejména pokud nejsou dostupné historické údaje o používání této vody pro chov larev obojživelníků. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno před začátkem zkoušení a/nebo například každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 2.

Koncentrace jódu ve zkušební vodě

17. K tomu, aby mohla štítná žláza syntetizovat thyroidální hormony na podporu normální metamorfózy, musí mít larvy k dispozici dostatek jodidu podávaného současně vodou i potravou. V současnosti neexistují žádné empiricky podložené pokyny ohledně minimální koncentrace jodidu v potravě nebo vodě pro zajištění správného vývoje. Dostupnost jodidu však může ovlivnit schopnost tyreoidálního systému reagovat na činitele ovlivňující činnost štítné žlázy, a jak známo, moduluje bazální aktivitu štítné žlázy, což si zasluhuje pozornost při interpretaci výsledků provedené histopatologie štítné žlázy. Na základě předchozích prací byla prokázána funkční způsobilost analýzy při koncentraci jodidu (I^{-}), která se v ředicí vodě pohybovala mezi 0,5 a 10 µg/l. Optimální hodnota minimální koncentrace jodidu (přidávaného jako sodná nebo draselná sůl) v ředící vodě by měla po celou dobu zkoušky činit 0,5 µg/l. Pokud je zkušební voda rekonstituována z deionizované vody, měl by se přidat jód v minimální koncentraci 0,5 µg/l. Změřené koncentrace jodidu ze zkušební vody (tj. ředicí vody) a doplnění jódu či jiných solí (jsou-li použity) do zkušební vody je třeba uvést. Kromě zkušební vody může být měřen také obsah jódu v potravě.

Systém expozice

18. Zkouška byla vypracována pomocí průtokového systému ředění. Složky systému, které přicházejí do styku s vodou, by měly být vyrobeny ze skla, nerezové oceli a/nebo jiných chemicky inertních materiálů. Jako expoziční nádrže by měla sloužit akvária ze skla nebo nerezové oceli a využitelný objem nádržky by měl být mezi 4,0 a 10,0 l (minimální hloubka vody 10 až 15 cm). Systém by měl být schopen podporovat všechny zkušební koncentrace, kontrolu a v případě potřeby kontrolu s rozpouštědlem, se čtyřmi replikáty na expozici a osmi v kontrolách. Průtoková rychlost by měla být u všech nádob stejná a neměnná, jednak kvůli zachování biologických podmínek, jednak kvůli expozici chemické látce. Doporučuje se, aby byly průtoky přiměřené (např. výměna objemu nádrže alespoň pětkrát denně), aby nedošlo k poklesu koncentrace chemické látky v důsledku metabolismu zkušebních organismů a vodních organismů přítomných v akváriu nebo abiotickými cestami degradace (hydrolýzou, fotolýzou) nebo zánikem odpařením, sorpcí). Expoziční nádrže by k určité pozici v systému expozice měly být přiřazeny náhodně, aby se snížily potenciální poziční vlivy, včetně mírných rozdílů v teplotě, intenzitě osvětlení apod. Další informace o nastavení průtokových systémů expozice jsou uvedeny v publikaci *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Dávkování chemické látky: příprava zkušebních roztoků

19. Zkušební roztoky v expozičním systému se připravují tak, že se zásobní roztok zkoušené chemické látky přivádí do systému vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Objem zkušebního roztoku v každé komoře by měl být vyměněn minimálně pětkrát denně.

20. Zkoušenou chemickou látku je možné zavést do systému různým způsobem, v závislosti na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Před zkouškou je proto třeba získat výchozí informace o chemické látce, které jsou podstatné pro stanovení její testovatelnosti. K užitečným informacím o vlastnostech jednotlivých zkoušených chemických látek patří strukturní vzorec, molekulová hmotnost, čistota, stabilita ve vodě a na světle, pK_a a K_{ow}, rozpustnost ve vodě (nejlépe ve zkušebním médiu) a tlak par, jakož i výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (zkušební metoda C.4 (17) nebo C.29 (18)). Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí, zda může dojít ke ztrátám v důsledku odpařování zkoušené chemické látky. Provedení této zkoušky bez výše uvedených informací by mělo být pečlivě zváženo, neboť plán studie bude záviset na fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a bez těchto dat může být obtížné interpretovat výsledky, případně výsledky nemusí dávat smysl. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství zkoušené chemické látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Zkoušené chemické látky rozpustné ve vodě mohou být rozpuštěny v přiměřeném množství ředicí vody v koncentraci, která umožňuje dávkování v cílové zkušební koncentraci v průtokovém systému. Chemické látky, které jsou kapalné nebo pevné při pokojové teplotě a jsou středně rozpustné ve vodě, mohou vyžadovat sytící kolony kapalina: kapalina nebo pevná látka: pevná látka (např. válec ze skelné vaty) (19). I když je možné podávat velmi hydrofobní zkoušené chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je málo zkušeností.

21. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mícháním a/nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (20). Upřednostňuje se použití zkušebního systému bez rozpouštědel; avšak různé zkoušené chemické látky budou mít rozličné fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou vyžadovat různé přístupy při přípravě vody pro expozici chemické látce. Měla by být vynaložena maximální snaha nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože: 1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu“ souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) neexistence dřívějších údajů, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má významné dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (21). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních kontrolních údajů o rozpouštědle. Nejsou-li k dispozici dřívější údaje, je třeba před provedením konečné studie stanovit vhodnost rozpouštědla. V případě, že se použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (21) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnižší (např. ≤ 20 µl/l), aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (22).

Zkušební organismy

Zkušební druh

22. Zkušebním druhem je *X. laevis*, protože: 1) se běžně chová v laboratořích na celém světě, 2) je snadno dostupný od komerčních dodavatelů a 3) lze stanovit jeho genetické pohlaví.

Péče o dospělé jedince a množení

23. Správná péče a chov *X. laevis* jsou popsány ve standardizovaném pokynu (23). Chov a péči o *X. laevis* popisuje také Read (24). Množení se provádí tak, že se třem až pěti párům dospělých samiček a samečků vstřikuje intraperitoneálně lidský choriogonadotropin (hCG). Samičkám ve vzorku se vstříkne např. přibližně 800–1 000 IU a samečkům 500–800 IU hCG rozpuštěného v 0,6–0,9 % solném roztoku (nebo Ringerově žabím roztoku, izotonickém roztoku pro použití u obojživelníků). Injekční objemy by měly být přibližně 10 µl/g tělesné hmotnosti (~1 000 µl). Poté jsou indukované chovné páry drženy ve velkých nádržích, v klidu a ve statických podmínkách, aby se podpořil amplexus.

Na dně každé množicí nádrže by mělo být nepravé dno z nerezového ocelového pletiva (např. otvory 1,25 cm), které umožní propadnutí vajíček na dno nádrže. Žáby, kterým se vstříkne hCG pozdě odpoledne, obvykle nakladou většinu vajíček do druhého dne dopoledne. Po uvolnění a oplodnění dostatečného množství vajíček by dospělí jedinci měli být z množicích nádrží odstraněni. Vajíčka se poté sesbírají a slizový obal se odstraní ošetřením v L-cysteinu (23). Připraví se 2 % roztok L-cysteinu a jeho hodnota pH se upraví na 8,1 pomocí 1 M NaOH. Tento roztok o teplotě 21 °C se přidá do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml obsahující vajíčka z jednoho kladení, lehce se promíchává po dobu jedné až dvou minut a poté se důkladně propláchne 6–8krát kultivační vodou o teplotě 21 °C. Vajíčka se poté přenesou do krystalizační misky a stanoví se, zda jsou životaschopné z > 70 % a vykazují jen minimální abnormality buněčného dělení embryí.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

24. Doporučuje se použít minimálně čtyři koncentrace chemické látky a příslušné kontroly (v případě potřeby včetně kontrol s rozpouštědlem). Obvykle se doporučuje rozdíl koncentrací (faktor odstupňování) nepřesahující 3,2.

25. Pro účely této zkoušky by se měly v maximální možné míře používat výsledky z již existujících studií obojživelníků pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace, aby se nepoužívaly koncentrace, které jsou zjevně toxické. Ke stanovení této koncentrace mohou přispět například informace o kvantitativním vztahu mezi strukturou a aktivitou, analogické údaje a data z již existujících studií obojživelníků, jako je analýza metamorfózy obojživelníků, zkušební metoda C.38 (25) a analýza teratogeneze žabích embryí – *Xenopus* (23), anebo zkoušek na rybách, jako jsou zkušební metody C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Před provedením analýzy LAGDA může být provedena zkouška ke zjištění rozsahu. Doporučuje se, aby expozice ke zjištění rozsahu byla zahájena do 24 hodin po fertilizaci a pokračovala po dobu 7–14 dnů (v případě potřeby i déle) a aby byly zkoušené koncentrace nastaveny tak, aby intervaly mezi jednotlivými zkoušenými koncentracemi nebyly větší než faktor 10. Výsledky zkoušky ke zjištění rozsahu by měly sloužit pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace při analýze LAGDA. Nezapomeňte, že pokud musí být použito rozpouštědlo, pak může být vhodnost tohoto rozpouštědla (tj. zda může mít dopad na výsledek studie) stanovena v rámci studie ke zjištění rozsahu.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

26. Měly by se použít minimálně čtyři replikované nádrže na každou zkoušenou koncentraci a minimálně osm replikátů pro kontroly (a v případě potřeby pro kontrolu s rozpouštědlem) (tj. počet replikátů v kontrolách a v každé kontrole s rozpouštědlem by měl být dvakrát tak velký jako počet replikátů každé expoziční skupiny, aby byla zajištěna správná statistická síla). Každý replikát by měl obsahovat maximálně 20 jedinců. Minimální počet zpracovaných jedinců bude 15 (5 pro dílčí vzorek stádia NF 62 a 10 juvenilních jedinců). Do každého replikátu se však přidají další jedinci, aby se tak kompenzovala možná mortalita a zachoval se kritický počet 15.

POSTUP

Přehled analýzy

27. Analýza se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje do vývoje juvenilních jedinců. Každý den se kontroluje mortalita a případné známky abnormálního chování. Ve stádiu NF 62 se odebere dílčí vzorek larev (maximálně 5 jedinců na replikát) a vyšetří se jednotlivé sledované parametry (tabulka 1). Poté, co všichni jedinci dosáhnou stádia NF 66, tj. dokončení metamorfózy (nebo po 70 dnech od zahájení studie, pokud toto datum nastane dříve), se provede náhodná redukce (avšak bez odebírání dílčích vzorků), aby se počet jedinců snížil (10 na nádrž) (viz odstavec 43), a zbývající jedinci jsou i nadále exponováni až do 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole. Při ukončení zkoušky (odebírání vzorků juvenilních jedinců) se provedou další měření (tabulka 1).

Podmínky expozice

28. Úplný souhrn zkušebních parametrů lze najít v dodatku 3. V průběhu doby expozice se denně měří množství rozpuštěného kyslíku, teplota a pH zkušebních roztoků. Jednou měsíčně se měří konduktivita, zásaditost a tvrdost. Pokud jde o teplotu vody zkušebních roztoků, rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi (v rámci jednoho dne) by neměly překročit 1,0 °C. Také u hodnoty pH zkušebních roztoků by rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi neměly překročit 0,5.

29. Expoziční nádrže mohou být každý den čištěny odsáváním, aby se z nich odstranila nezkonzumovaná potrava a odpadní produkty, přičemž je třeba dávat pozor, aby nedošlo ke křížové kontaminaci nádrží. Je nutné dbát na minimalizaci stresu a traumat zvířat, zejména během přemisťování, čištění akvárií a manipulace. Je třeba se vyvarovat stresových podmínek/činností, jakými jsou hlasitý a/nebo nepřetržitý hluk, klepání na akvária, vibrace v nádržích.

Délka expozice zkoušené chemické látce

30. Expozice se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 (≤ 45 dnů od zahájení studie) v kontrolní skupině. Analýza LAGDA trvá obvykle 16 týdnů (maximálně 17 týdnů).

Zahájení analýzy

31. Rodičovská zvířata použitá pro zahájení analýzy by měla v minulosti prokazatelně vyprodukovat potomstvo, u nějž lze geneticky určit pohlaví (dodatek 5). Po vytření dospělých jedinců se sesbírají embrya, ošetří se cysteinem, aby se z nich odstranil slizový povlak, a zkontroluje se jejich životaschopnost (23). Ošetření cysteinem umožňuje, aby se embrya při manipulaci v průběhu screeningu nenalepila na povrchy. Screening probíhá pod stereomikroskopem pomocí očního kapátka vhodné velikosti, kterým se odstraňují neživotaschopná embrya. Preferuje se, aby byl pro zkoušku použit jeden potěr s větší než 70 % životaschopností. Embrya ve stádiu NF 8–10 se náhodně rozdělí do expozičních nádrží obsahujících příslušný objem ředící vody tak, aby každá nádrž obsahovala 20 embryí. S embryi je třeba při tomto přemístění zacházet opatrně, aby se minimalizoval manipulační stres a předešlo jakémukoli poranění. 96 hodin po fertilizaci by měli pulci vyplavat ve vodním sloupci nahoru a začít se přichytávat na stěny nádrže.

Krmný režim

32. Krmivo a změna krmného režimu v průběhu jednotlivých vývojových stádií *X. laevis* představují velmi důležitý aspekt protokolu LAGDA. Při nadměrném krmení v průběhu larvální fáze obvykle dochází ke zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatek 8) a tomu by se mělo zabránit. Naopak při nedostatečném krmení v průběhu larvální fáze dochází k vysoce variabilním vývojovým výsledkům mezi kontrolami, což by potenciálně mohlo narušit statistickou sílu nebo způsobit zavádějící výsledky zkoušky. V dodatku 4 je uvedeno doporučené krmivo a krmné režimy pro larvy a juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách, ale jsou přípustné i alternativy, pokud zkoušené organismy rostou a vyvíjejí se uspokojivě. Je důležité poznamenat, že pokud se měří endokrinní specifické cílové parametry, nesmí krmivo obsahovat endokrinní účinné látky, jako je sója.

Krmení larev

33. Doporučená potrava pro larvy zahrnuje krmivo pro mladé lososovité ryby, řasy *Spirulina* a vločky pro okrasné rybičky (např. vločky TetraFin®, Tetra, Německo) promíchané v kultivační (nebo ředicí) vodě. Tato směs se podává třikrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech. Pulci se také krmí živou žábronožkou, rod *Artemia*, 24 hodin starými larvami (nauplie), a to dvakrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech, počínaje dnem 8 po fertilizaci. Krmení, které by mělo být stejné v každé zkušební nádrži, by mělo umožňovat správný růst a vývoj pokusných zvířat, aby byla zajištěna reprodukovatelnost a přenositelnost výsledků analýzy: 1) střední doba do stádia NF 62 v kontrolách by měla být ≤ 45 dnů a 2) doporučuje se, aby střední hmotnost byla v kontrolách ve stádiu NF 62 v rozmezí 1,0 ± 0,2 g.

Krmení juvenilních jedinců

34. Po dokončení metamorfózy zahrnuje krmný režim prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, např. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatek 4). Pro malé žabky (rané juvenilní stádium) se peletky krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se podrtí tloučkem v třecí misce, aby se zmenšila jejich velikost. Jakmile jsou juvenilní žabky dostatečně velké, aby mohly konzumovat celé peletky, není mletí nebo drcení dále nutné. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Krmení juvenilních jedinců by mělo umožňovat správný růst a vývoj organismů: doporučuje se střední hmotnost kontrolních juvenilních jedinců v rozmezí 11,5 ± 3 g při ukončení analýzy.

Analytická chemie

35. Před zahájením analýzy je třeba stanovit stabilitu zkoušené chemické látky (např. rozpustnost, odbouratelnost a těkavost) a všech potřebných analytických metod například pomocí stávajících informací nebo znalostí. Při dávkování přes ředicí vodu se doporučuje, aby byly zkoušené roztoky z každé replikované nádrže před zahájením zkoušky analyzovány, aby se ověřila účinnost systému. Během doby expozice se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe každý týden alespoň v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ± 20 % jmenovité koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. Také variační koeficient (CV) měřených zkoušených koncentrací by měl být po celou dobu zkoušky v rámci expozice v každé koncentraci udržován na 20 % nebo méně. Když změřené koncentrace nezůstávají v rámci 80–120 % nominální koncentrace (například při testování vysoce biologicky rozložitelných nebo adsorpčních chemických látek), je třeba stanovit účinné koncentrace a vyjádřit je ve vztahu k průměrné koncentraci pro průtokové zkoušky.

36. Rychlosti průtoku ředicí vody a zásobního roztoku by měly být ve vhodných intervalech kontrolovány (např. třikrát týdně) po celou dobu expozice. U chemických látek, které nelze detekovat při některých nebo při všech nominálních koncentracích (např. v důsledku rychlého rozkladu nebo adsorpce ve zkušebních komorách nebo při výrazné akumulaci chemické látky v organismu exponovaných zvířat), se doporučuje přizpůsobit rychlost obměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkoušené koncentrace udržovány pokud možno konstantní.

Pozorování a měření sledovaných parametrů

37. Sledovanými parametry hodnocenými v průběhu expozice jsou parametry naznačující toxicitu včetně mortality a abnormálního chování, jako jsou klinické známky onemocnění anebo generalizované toxicity, a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i patologické parametry, které mohou být odpovědí na generalizovanou toxicitu i na endokrinní způsoby účinku působící na dráhy zprostředkované estrogeny, androgeny nebo hormony štítné žlázy. Doplňkově může být při ukončení analýzy změřena koncentrace VTG v plazmě. Měření VTG může být užitečné pro pochopení výsledků studie v souvislosti s endokrinními mechanismy pravděpodobných endokrinních disruptorů. Sledované parametry a harmonogramy měření jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Přehled sledovaných parametrů u zkoušky LAGDA

Sledované parametry (*)	Denně	Průběžný odběr vzorků (odběr vzorků larev)	Ukončení zkoušky (odběr vzorků juvenilních jedinců)
Mortalita a abnormality	X		
Doba do stádia NF 62		X	
Histo(pato)logie (štítná žláza)		X	
Morfometrické údaje (růst jako hmotnost a délka)		X	X
Jaterní somatický index (LSI)			X
Podíly genetického/fenotypového pohlaví			X
Histopatologie (gonády, reprodukční cesty, ledviny a játra)			X
Vitelogenin (VTG) (doplňkově)			X

(*) Všechny sledované parametry se analyzují statisticky.

Mortalita a denní pozorování

38. Všechny zkušební nádrže je třeba denně kontrolovat, zda neobsahují mrtvé jedince, a zaznamenávat mortalitu v každé nádrži. Mrtvé jedince ihned po jejich zpozorování je třeba ze zkušební nádrže odstranit. Vývojová stádia mrtvých zvířat se kategorizují jako stádium před NF 58 (před vytvořením předních končetin), stádium NF 58 až stádium NF 62, stádium NF 63 až stádium NF 66 (mezi stádiem 62 a úplnou absorpcí ocasu) nebo stádium po NF 66 (po larválním stádiu). Míra mortality vyšší než 20 % může ukazovat na nevhodné zkušební podmínky nebo na zjevně toxické účinky zkoušené chemické látky. Zvířata bývají nejcitlivější na mortalitu indukovanou jinými událostmi než chemickou látkou v prvních několika dnech vývoje po nakladení vajíček a v průběhu vrcholu metamorfózy. Tato mortalita může být zjevná z kontrolních dat.

39. Dále by mělo být zaznamenáno každé pozorované abnormální chování, makroskopicky viditelné malformace (např. skolióza) nebo léze. Pozorované případy skoliózy je třeba spočítat (incidence) a stanovit její stupeň závažnosti (např. nenápadná – NR, minimální – 1, střední – 2, těžká – 3; dodatek 8). Je třeba usilovat o minimalizaci prevalence střední až těžké skoliózy (např. pod 10 % v kontrolách) po celou dobu studie, přestože větší prevalence abnormalit v kontrolách nemusí být nutně důvodem pro zastavení zkoušky. Pro standardní chování je typické, že larvy jsou ponořeny ve vodním sloupci, ocas mají zvednutý výše, než je hlava, pravidelně rytmicky mrskají ocasní ploutví, pravidelně vyplouvají k hladině, zavírají žábry a reagují na podněty. Nestandardní chování by zahrnovalo například plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět. U jedinců po metamorfóze by kromě výše uvedeného normálního chování měly být zaznamenány velké rozdíly ve spotřebě potravy mezi expozicemi. Závažné malformace a léze mohou zahrnovat například morfologické abnormality (např. deformace končetin), krvácivé léze, bakteriální nebo plísňové infekce. Výskyt lézí na hlavě juvenilních jedinců bezprostředně za nosními dírkami může být indikací nedostatečné vlhkosti. Tato stanovení jsou kvalitativní, měla by být považována za rovnocenná klinickým příznakům onemocnění/stresu a porovnána s kontrolními zvířaty. Pokud je míra výskytu v exponovaných nádržích větší než v kontrolních, pak tento výskyt nebo míru výskytu je třeba považovat za důkaz zjevné toxicity.

Dílčí odběr vzorků larev

Popis dílčího odběru vzorků larev:

40. Pulci, kteří dosáhli stádia NF 62, se z nádrží odstraní a použijí se jako vzorky, nebo se přemístí do další části expozice v nové nádrži, případně se fyzicky oddělí od zbývajících pulců ve stejné nádrži dělící přepážkou. Pulci se každý den kontrolují a zaznamená se den studie, kdy jednotliví pulci dosáhnou stádia NF 62. Rozhodující charakteristikou při tomto hodnocení je tvar hlavy. Jakmile se hlava zmenší natolik, že je vizuálně zhruba stejně široká jako trup pulce a přední končetiny na úrovni střední části srdce, počítá se tento jedinec jako pulec, který dosáhl stádia NF 62.

41. Cílem je odebrat celkem pět vzorků pulců ve stádiu NF 62 z každé replikované nádrže. Provádí se to zcela náhodně, ale je třeba rozhodnout předem. Hypotetický příklad replikované nádrže je uveden na **obrázku 1**. Pokud je v konkrétní nádrži 20 přeživších pulců, když první jednotlivec dosáhne stadia NF 62, vybere se z čísel 1–20 pět náhodných čísel. Pulec číslo 1 je první jednotlivec, který dosáhl stadia NF 62, a pulec číslo 20 je poslední jedinec v nádrži, který dosáhl stádia NF 62. Podobně, pokud je v konkrétní nádrži 18 přeživších pulců, vybere se z čísel 1–18 pět náhodných čísel. Toto se udělá u každé replikované nádrže, když první jednotlivec ve zkoušce dosáhne stadia NF 62. Jestliže jsou při odběru vzorků ve stádiu NF 62 mortality, je třeba zbývající vzorky opět randomizovat podle toho, kolik larev zbylo do stádia NF 62 a kolik dalších vzorků je zapotřebí pro dosažení celkem pěti vzorků z tohoto replikátu. V den, kdy pulec dosáhne stádia NF 62, se udělá poznámka v připraveném schématu pro odběr vzorků, aby bylo možné určit, zda je daný jednotlivec použit jako vzorek, nebo fyzicky oddělen od zbývajících pulců pro další expozici. V uvedeném příkladu (obrázek 1) je první jednotlivec, který dosáhne stádia NF 62 (tj. políčko číslo jedna), fyzicky oddělen od ostatních larev, pokračuje v expozici a den studie, kdy tento jednotlivec dosáhl stádia NF 62, se zaznamená. Poté se stejným způsobem pokračuje u jednotlivců číslo 2 a číslo 3 jako u čísla 1 a poté je jednotlivec číslo 4 použit jako vzorek pro stanovení růstu a histologické vyšetření štítné žlázy (podle tohoto příkladu). Tento postup pokračuje až do doby, kdy se 20. jednotlivec buď připojí ke zbývajícím jednotlivcům ve stádiu po NF 62, nebo je použit jako vzorek. Použitý postup náhodného výběru musí každému organismu ve zkoušce poskytnout stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán. Toho lze dosáhnout použitím jakékoli metody náhodného výběru, avšak vyžaduje se také, aby každý pulec byl v určité době v průběhu odběru dílčích vzorků ve stádiu NF 62 odloven.

Obrázek 1

Hypotetický příklad režimu odběru vzorků ve stádiu NF 62 u jedné replikované nádrže



42. Sledovanými parametry při odběru vzorků v larválním stádiu jsou: 1) doba do stádia NF 62 (tj. počet dnů mezi fertilizací a stádiem NF 62), 2) externí abnormality, 3) morfometrické údaje (např. hmotnost a délka) a 4) histologie štítné žlázy.

Humánní usmrcení pulců

43. Pulci odebíraní jako vzorek ve stádiu NF 62 (5 jednotlivců na replikát) se usmrtí ponořením do vhodného množství (např. 500 ml) roztoku anestetika (např. 0,3 % roztok MS-222, trikain methan sulfonát, CAS.886-86-2) na dobu 30 minut. Roztok MS-222 by měl být pufrován bikarbonátem sodným na hodnotu pH přibližně 7,0, protože nepufrovaný roztok MS-222 je kyselý a dráždivý pro žabí kůži, což působí špatnou absorpci a zbytečný další stres pro organismy.

44. Pulec se pomocí podběráku vyjme z experimentální nádrže a přenese (umístí) do eutanazačního roztoku. Zvíře se správně usmrtí a je připraveno na pitvu, když nereaguje na externí podněty, jako je zaštípnutí zadní končetiny kleštičkami.

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

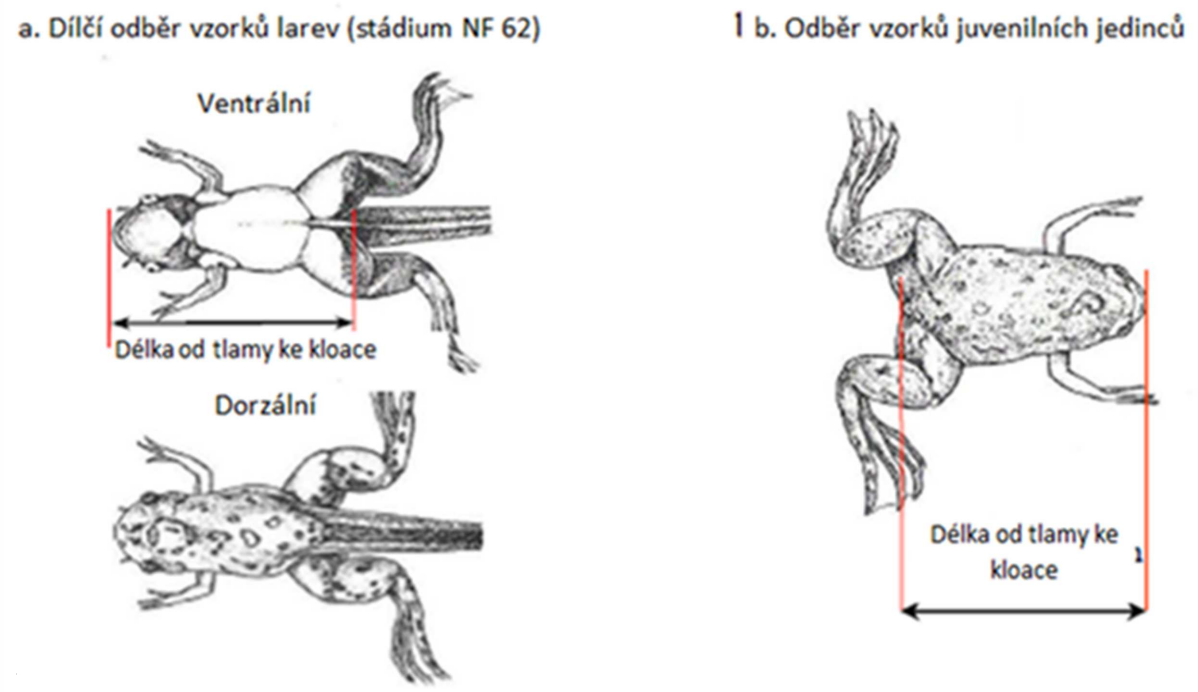
45. Stanovení hmotnosti ve vlhkém stavu (na nejbližší mg) a délky těla od tlamy po kloaku (SVL) (na nejbližší 0,1 mm) u každého půlce se provede okamžitě poté, co přestane reagovat v důsledku anestetika (obrázek 2a). Na změření SVL z fotografie může být použit software pro analýzu obrazu. Pulci se před vážením osuší, aby se z nich odstranila nadbytečná ulpělá voda. Po změření velikosti těla (hmotnost a SVL) se zaznamenají nebo zapíší všechny velké morfologické abnormality anebo klinické známky toxicity, jako je skolióza (viz dodatek 8), petechie a krvácení, přičemž se doporučuje elektronická dokumentace. Nezapomeňte, že petechie jsou drobná tečkovitá krvácení červené nebo fialové barvy v kožních vlásečnicích.

Odběr a zpracování tkání

46. U dílčích vzorků odebraných v larválním stádiu se histologicky vyšetří štítná žláza. Dolní část těla za předními končetinami se odstraní a zlikviduje. Zastřižené mrtvé tělo se zafixuje v Davidsonově fixačním médiu. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Aby se zájmové tkáně adekvátně zafixovaly, je třeba zajistit správné promíchání nebo cirkulaci fixačního roztoku. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu (1) (29).

Histologie štítné žlázy

47. U každého dílčího vzorku larvy (zafixované tkáně) se histologicky vyšetří štítná žláza, tj. stanoví se diagnóza a stupeň závažnosti (29) (30).



Obrázek 2: Značky pro měření délky těla od tlamy po kloaku při analýze LAGDA ve stádiu NF 62 a) a u juvenilních žab b). Rozhodující charakteristiky stádia NF 62 a): hlava má stejnou šířku jako trup, délka čichového nervu je kratší než průměr čichového bulbu (pohled zezadu) a přední končetiny jsou na úrovni srdce (pohled zepředu). Obrázky převzaty z publikace Nieuwkoop a Faber (1994).

Konec expozice larev

48. Vzhledem k počátečnímu počtu pulců lze předpokládat, že jedinců, kteří se nebudou vyvíjet normálně a nedokončí metamorfózu (stádium NF 66) v přiměřeném čase, bude pravděpodobně malé procento. Larvální část expozice by neměla překročit 70 dní. Všechny pulce zbývající na konci tohoto období je třeba usmrtit (viz odstavec 43), stanovit jejich hmotnost ve vlhkém stavu a SVL, stanovit stádium podle Nieuwkoopa and Fabera, 1994 a zaznamenat případné vývojové abnormality.

Redukce po stádiu NF 66

49. Od stádia NF 66 (úplná resorpce ocasu) až do ukončení expozice by mělo pokračovat deset jedinců na nádrž. Jakmile tedy všechna zvířata dosáhla stadia NF 66 nebo po 70 dnech (pokud toto datum nastane dříve) je třeba provést redukci. Zvířata po stádiu NF 66, která nebudou nadále exponovaná, se vybírají náhodně.

50. Zvířata, která nejsou vybrána pro další expozici, se utratí (viz odstavec 43). U každého zvířete se provede měření vývojového stádia, stanoví se jeho hmotnost za vlhka a SVL (obrázek 2b) a provede se podrobná pitva. Fenotypové pohlaví (podle morfologie gonád) se označí jako samičí, samčí nebo neurčité.

Odběr vzorků juvenilních jedinců

Popis odběru vzorků juvenilních jedinců

51. Zbývající zvířata jsou nadále exponována až do 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole s ředicí vodou (anebo v kontrole s rozpouštědlem v příslušných případech). Na konci doby expozice se zbývající zvířata (maximálně 10 žab na replikát) usmrtí a změří se nebo vyhodnotí jednotlivé sledované parametry a zaznamenají se: 1) morfometrické údaje (hmotnost a délka), 2) podíl fenotypového/genotypového pohlaví, 3) hmotnost jater (jaterní somatický index), 4) histopatologie (gonády, reprodukční trakt, játra a ledviny) a doplňkově 5) plazmatický VTG.

Humánní usmrcení žab

52. Juvenilní vzorky, žáby po metamorfóze se usmrtí intraperitoneální injekcí anestetika, např. 10 % MS-222 ve vhodném fosfátovém pufru. Jakmile žáby přestanou reagovat (obvykle zhruba 2 minuty po injekci, pokud je použit 10 % MS-222 v dávce 0,01 ml na 1 g žáby), mohou se z nich odebrat vzorky. I když juvenilní žáby mohou být ponořeny do vyšší koncentrace anestetika (MS-222), zkušenosti ukazují, že při použití této metody trvá déle, než na ně anestetikum začne působit, přičemž doba působení nemusí být adekvátní, aby umožnila odběr vzorků. Injekce představuje efektivní a rychlé usmrcení před odběrem vzorků. Odběr vzorků by neměl být zahájen, dokud není potvrzeno, že žáby nereagují, aby bylo zajištěno, že jsou zvířata mrtvá. Jestliže žáby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je žába usmrcena v důsledku morbidity, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou žáby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat žáby pro případnou histopatologii).

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

53. Měření hmotnosti ve vlhkém stavu a SVL je stejné jako měření popsané u odběru dílčích vzorků larev.

Plazmatický vitelogenin (VTG) (doplňkově)

54. VTG je široce akceptovaný biologický marker vyplývající z expozice estrogenovým chemickým látkám. Ve zkoušce LAGDA může být doplňkově měřen plazmatický VTG u juvenilních vzorků (může to být zvláště podstatné v případě podezření, že zkoušená chemická látka je estrogen).

55. Odříznou se zadní končetiny usmrcených juvenilních jedinců a z heparinizované vlásečnice se odebere krev (i když mohou být vhodné i alternativní metody odběru krve, jako je srdeční punkce). Krev se vystříkne do mikrozkumavky do odstředivky (např. o objemu 1,5 ml) a odstředěním se získá plazma. Vzorky plazmy se skladují při teplotě −70 °C nebo nižší až do stanovení VTG. Koncentraci VTG v plazmě lze změřit metodou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) (dodatek 6) nebo alternativní metodou, jako je například hmotnostní spektrometrie (31). Vzhledem k větší senzitivitě jsou vhodnější protilátky specifické pro daný druh.

Určení genetického pohlaví

56. Genetické pohlaví každé juvenilní žáby se posuzuje podle markerů, které vypracoval Yoshimoto *et al.* (11). Aby mohlo být stanoveno genetické pohlaví, odebere se část (nebo celá) jedné zadní končetiny (nebo jakékoli jiné tkáně) odpreparované při pitvě a uloží se do mikrozkumavky (vzorky žabí tkáně mohou být získány z jakékoli tkáně). Tkáň lze uchovávat při teplotě −20 °C nebo nižší až do izolace kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Izolace DNA z tkání může být provedena pomocí komerčně dostupných sad a analýza přítomnosti nebo nepřítomnosti markeru se provádí metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) (dodatek 5). Obecně je shoda mezi histologickým pohlavím a genotypem u všech kontrolních zvířat v okamžiku odběru vzorků v juvenilním stádiu v kontrolních skupinách větší než 95 %.

Odběr tkání a jejich fixace pro histopatologii

57. Při posledním odběru vzorků se odeberou gonády, reprodukční trakt, ledviny a játra pro histologickou analýzu. Otevře se břišní dutina, vypreparují se játra a zváží se. Poté se opatrně vyjmou z podbřišku trávicí orgány (například žaludek, střeva), aby se odhalily gonády, ledviny a reprodukční trakt. Všechny závažné morfologické abnormality gonád se zaznamenají. Nakonec se odeberou zadní končetiny, pokud již nebyly odebrány za účelem odběru krve. Odebraná játra a mrtvé tělo s gonádami ponechanými na místě je třeba okamžitě uložit do Davidsonova fixačního roztoku. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu (1) (29).

Histopatologie

58. Každý juvenilní vzorek se histologicky vyšetří, zda nevykazuje patologii gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jaterní tkáně, tj. stanoví se diagnóza a určí stupeň závažnosti (32). Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp (např. vaječník, varle, obojetný pohlavní vývoj) a společně s jednotlivými měřeními genetického pohlaví mohou být tato pozorování použita pro výpočet podílů fenotypových/genotypových pohlaví.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Statistická analýza

59. Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data (hmotnost, SVL, LSI, VTG), 2) data o době do události u vývojových podílů (tj. dny do stádia NF 62 od zahájení analýzy) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření.

60. Doporučuje se, aby uspořádání zkoušky a výběr statistického testu umožnily dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC nebo EC_x. Statistická analýza údajů (obvykle střední hodnoty replikátů) by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). V dodatku 7 této zkušební metody je uvedeno doporučené schéma rozhodování při statistické analýze a pokyny pro zpracování údajů a výběr nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být při zkoušce LAGDA použit.

61. Údaje z juvenilních vzorků (např. růst, LSI) by měly být analyzovány samostatně pro každé genotypové pohlaví, protože genotypové pohlaví se určuje u všech žab.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných replikátů a expozic

62. Replikáty a expozice mohou být zpochybněny v důsledku nadúmrtnosti při zjevné toxicitě, onemocnění nebo technické chybě. Jestliže je expozice zpochybněná v důsledku onemocnění nebo technické chyby, měly by být pro analýzu k dispozici alespoň tři nezpochybněné expozice se třemi nezpochybněnými replikáty. Jestliže se u vysoké expozice (expozic) objeví zjevná toxicita, je lepší, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty (odpovídající metodě maximální tolerované koncentrace podle pokynu OECD (34)). Vedle mortality mohou známky zjevné toxicity zahrnovat ovlivnění chování (např. plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině), morfologické léze (např. hemoragické léze, abdominální edém) nebo inhibici normálních odpovědí na krmení při kvalitativním srovnání s kontrolními zvířaty.

Kontrola s rozpouštědlem

63. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla (pokud bylo použito). To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředicí vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost a délka), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředicí vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředicí vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se, porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s ředicí vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředicí vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

64. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,

— jednosložková látka:

fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen),

— vícesložková látka, UVCB a směsi:

charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh:

— vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

— incidence skoliózy u dosavadních kontrol pro použitou chovanou populaci.

Zkušební podmínky:

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet pokusných organismů v každém replikátu),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),

— výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad o toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), celkový obsah jódu, obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušebního média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily kritéria validity,

— následující údaje o kontrolní skupině (plus o kontrole s rozpouštědlem, je-li použita) a o expozičních skupinách: pozorovaná mortalita a abnormalita, doba do stádia NF 62, histologické vyšetření štítné žlázy (pouze vzorek larev), růst (hmotnost a délka), LSI (pouze juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (pouze juvenilní vzorek), výsledky histopatologického vyšetření gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (pouze juvenilní vzorek) a plazmatický VTG (pouze juvenilní vzorek, je-li stanoven),

— metoda statistické analýzy a zpracování údajů (použitý statistický test nebo model),

— koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,

— nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při $\alpha = 0{,}05$), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,

— všechny odchylky od zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.

65. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

66. Měla by být vypočtena střední doba do stádia NF 62 v kontrolách a uvedena jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka. Podobně by u expozic měl být vypočten expoziční medián a uveden jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka.

LITERATURA

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: s. 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Kapitola C.4 této přílohy, Zkouška snadné biologické rozložitelnosti.

(18) Kapitola C.29 této přílohy, Hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO_2 v těsně uzavřených lahvičkách (Headspace Test).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Kapitola C.38 této přílohy, Analýza metamorfózy obojživelníků.

(26) Kapitola C.48 této přílohy, Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.

(27) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.

(28) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Dodatek 1

DEFINICE

Hlavní ukazatel: způsobuje účinek na úrovni populace.

Chemická látka: látka nebo směs.

ELISA: enzymová imunosorpční analýza.

EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

dpf: dny po fertilizaci.

Průtoková metoda: zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC): je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 7.

Medián letální koncentrace (LC_{50}): je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

Dodatek 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

Dodatek 3

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU LAGDA

1. Zkušební druh	*Xenopus laevis*
2. Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3. Teplota vody	Nominální teplota je 21 °C. Střední teplota po dobu trvání zkoušky je 21 ± 1 °C (rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 1,0 °C).
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální) 600–2 000 lux (lumen/m^2) na povrchu vody
5. Fotoperioda	12 h světlo: 12 h tma
6. Objem zkušebního roztoku a zkušební nádoby (nádrže)	4–10 l (minimální hloubka vody 10–15 cm) Akvária skleněná nebo z nerezové oceli
7. Výměny objemu zkušebních roztoků	Konstantní, s ohledem na zachování biologických podmínek a expozici chemické látce (např. objem nádrže se vymění 5x denně)
8. Stáří zkušebních organismů při zahájení	Stádium 8–10 podle Nieuwkoopa a Fabera (NF)
9. Počet organismů na replikát	20 zvířat (embryí)/nádrž (replikát) při zahájení expozice a 10 zvířat (juvenilních jedinců)/nádrž (replikát) po stádium NF 66 až do ukončení expozice
10. Počet expozic	Minimálně 4 expozice zkoušené chemické látce plus příslušná kontrola (kontroly)
11. Počet replikátů pro každou expozici	4 replikáty na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 8 replikátů pro kontrolu (kontroly)
12. Počet organismů na zkoušenou koncentraci	Minimálně 80 zvířat na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 160 zvířat pro kontrolu (kontroly)
13. Ředicí voda	Jakákoli voda, která umožňuje normální růst a vývoj *X. laevis* (např. pramenitá voda nebo voda z vodovodní sítě přefiltrovaná přes aktivní uhlí)
14. Provzdušňování	Není vyžadováno, ale provzdušňování nádrží může být nutné, jestliže hladina rozpuštěného kyslíku poklesne pod doporučené limity a jestliže je maximalizován nárůst průtoku zkušebního roztoku.
15. Rozpuštěný kyslík ve zkušebním roztoku	Rozpuštěný kyslík: ≥ 40 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem nebo ≥ 3,5 mg/l

16. pH zkušebního roztoku	6,5–8,5 (rozdíly mezi replikáty a expozicemi by neměly být větší než 0,5)
17. Tvrdost a zásaditost zkušebního roztoku	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Krmný režim	(viz dodatek 4)
19. Doba expozice	Od stádia NF 8–10 do deseti týdnů po střední době do stádia NF 62 ve vodě a/nebo kontrolní skupině s rozpouštědlem (maximálně 17 týdnů)
20. Biologické ukazatele	Mortalita (a abnormální jevy), doba do stádia NF 62 (vzorek larev), histologické vyšetření štítné žlázy (vzorek larev), růst (hmotnost a délka), jaterní somatický index (juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (juvenilní vzorek), histopatologie gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (juvenilní vzorek) a plazmatický vitelogenin (juvenilní vzorek, doplňkově)
21. Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík by měl být > 40 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody by měla být v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by měly být < 1,0 °C; pH zkušebního roztoku by mělo být v rozsahu 6,5 až 8,5; mortalita v kontrole by měla být ≤ 20 % a střední doba do stádia NF 62 v kontrole by měla být ≤ 45 dnů; střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat 1,0 ± 0,2, respektive 11,5 ± 3 g; měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot.

Dodatek 4

KRMNÝ REŽIM

Je třeba uvést, že ačkoli je tento krmný režim doporučován, jsou přípustné i alternativy, pokud budou zkušební organismy růst a vyvíjet se správnou rychlostí.

Krmení Larev

Příprava krmiva pro larvy

A. 1: 1 (obj.) krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)

1. Krmivo pro mladé lososovité ryby: míchejte 50 g krmiva pro mladé lososovité ryby (drobné granule nebo prášek) a 300 ml vhodné filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 20 sekund

2. Směs řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent): míchejte 12 g řas spirulina v tabletách a 500 ml filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 40 sekund, smíchejte 12 g přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu) s 500 ml filtrované vody a poté tyto dvě směsi slijte, čímž vznikne 1 litr krmiva s obsahem 12 g/l řas spirulina a 12 g/l přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu)

3. Smíchejte stejné objemy krmiva pro mladé lososovité ryby a směsi řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)

B. Žábronožka:

15 ml vajíček žábronožky se nechá vylíhnout v 1 l slané vody (připravené přidáním 20 ml NaCl do 1 l deionizované vody). Po provzdušňování po dobu 24 hodin při pokojové teplotě za konstantního osvětlení se žábronožka odloví. Žábronožka se nechá na dobu 30 minut usadit zastavením provzdušňování. Skořápky, které vyplavou v nádobě nahoru, se slijí a zlikvidují a žábronožka se přecedí přes vhodný filtr a přemístí do 30 ml filtrované vody.

Krmný protokol

V tabulce 1 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu larválních stádií expozice. Zvířata se krmí třikrát denně od pondělí do pátku a jednou denně o víkendu.

Tabulka 1

Krmný režim pro larvy *X. laevis* v průtokových podmínkách

Doba (*) (po fertilizaci	Krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)		Žábronožka	
	Pracovní dny (třikrát denně)	Víkend (jednou denně)	Pracovní dny (dvakrát denně)	Víkend (jednou denně)
Dny 4–14 (v týdnech 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ode dne 8 do 15) 1 ml (ode dne 16)	0,5 ml (ode dne 8 do 15) 1 ml (ode dne 16)
Týden 2	0,67 ml	2,4 ml		
Týden 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Týden 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Doba (*) (po fertilizaci	Krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)		Žábronožka	
	Pracovní dny (třikrát denně)	Víkend (jednou denně)	Pracovní dny (dvakrát denně)	Víkend (jednou denně)
Týden 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Týden 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týden 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týdny 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Den 0 je definován jako den podání injekce hCG.

Přechod z larválního krmiva na krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy larev se přechází na krmivo pro juvenilní jedince, které je popsáno níže. Při tomto přechodu se postupně snižuje množství krmiva pro larvy a zvyšuje množství krmiva pro juvenilní jedince. Lze to provést poměrným snižováním krmiva pro larvy a poměrným zvyšováním krmiva pro juvenilní jedince podle toho, jak každá skupina pěti pulců projde stádiem NF 62 a přiblíží se k dokončení metamorfózy ve stádiu NF 66.

Krmení juvenilních jedinců

Krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy (stádium 66) se krmný režim změní pouze na prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, o velikosti 3/32 palce (Xenopus Express™, FL, USA) nebo ekvivalentní.

Příprava drcených pelet pro larvy při přechodu na krmivo pro juvenilní jedince

Peletky krmiva pro žáby, které klesá pod hladinu, se krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se rozdrtí v misce s tloučkem, aby se jejich velikost zmenšila přibližně o 1/3. Při příliš dlouhém zpracování vznikne prášek, což se nedoporučuje.

Krmný protokol

V tabulce 2 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu juvenilních a dospělých vývojových stádií. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Je třeba poznamenat, že s postupem metamorfózy zvířata i nadále dostávají část krmiva ve formě žábronožky, dokud > 95 % zvířat nedokončí metamorfózu.

V den ukončení zkoušky by zvířata neměla být krmena, aby krmivo nezkreslilo stanovení hmotnosti.

Tabulka 2

Krmný režim pro juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách. Je třeba poznamenat, že zvířata, u nichž ještě neproběhla metamorfóza, včetně zvířat, u nichž je metamorfóza opožděna v důsledku expozice chemické látce, nemohou konzumovat nerozdrcené peletky.

Doba (*) (týdny po mediánu data metamorfózy)	Drcené peletky (mg na 1 žabku)	Celé peletky (mg na 1 žabku)
Když zvířata dokončí metamorfózu	25	0
Týdny 0–1	25	28
Týdny 2–3	0	110
Týdny 4–5	0	165
Týdny 6–9	0	220

(*) První den týdne 0 je mediánem data metamorfózy u kontrolních zvířat.

Dodatek 5

URČOVÁNÍ GENETICKÉHO POHLAVÍ (GENETICKÉ SEXOVÁNÍ)

Metoda určování genetického pohlaví pro*Xenopus laevis* vychází z publikace Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobné postupy určování genotypu lze v případě potřeby zjistit v této publikaci. Pokud je to považováno za vhodné, mohou být použity alternativní metody (např. qPCR vhodná pro vysoké propustnosti).

Primery X. laevis

Marker DM-W

Přímý:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzní:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivní kontrola

Přímý:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzní:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikace DNA

DNA purifikujte ze svalové nebo kožní tkáně např. pomocí sady Qiagen DNeasy pro krev a tkáně (kat. č. 69 506) nebo podobného výrobku podle přiložených pokynů. DNA lze vyluhovat z páteře s použitím menšího množství pufru, aby byly získány koncentrovanější vzorky, je-li to považováno za nezbytné pro analýzu PCR. Upozorňujeme, že DNA je celkem stabilní, je proto třeba dbát na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci, což by mohlo vést k chybnému určení samečků jako samiček nebo naopak.

Polymerázová řetězová reakce

Vzor protokolu s použitím sady JumpStart^{TM}*Taq* od společnosti Sigma je uveden v **tabulce 1**.

Tabulka 1

Vzor protokolu s použitím sady JumpStart^{TM} *Taq* od společnosti Sigma

Roztok master mix	1x (µl)	[Konečné množství]
NFW ([1])	11	–
10X pufr	2,0	–
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (po 10 mM)	0,4	200 µM
Marker pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM

Roztok master mix	1x (µl)	[Konečné množství]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/µl
Templát DNA	1,0	~ 200 pg/µl

([1]) Voda bez nukleázy Poznámka:
Poznámka: Připravte si větší množství roztoků master mix pro případné ztráty, k nimž může dojít při pipetování (příklad: 25x by se měly použít pouze pro 24 reakcí).

Reakce:

Roztok master mix	19,0 µl
Templát	1,0 µl
Celkem	20,0 µl

Profil termocykleru:

Krok 1.	94 °C	1 min
Krok 2.	94 °C	30 s
Krok 3.	60 °C	30 s
Krok 4.	72 °C	1 min
Krok 5.	Pokračovat podle kroku 2.	35 cyklů
Krok 6.	72 °C	1 min
Krok 7.	4 °C	udržovat

Výrobky PCR lze použít okamžitě v gelu nebo uchovávat při 4 °C.

Gelová elektroforéza v agaróze (vzor protokolu)

50X TAE

Tris	24,2 g
Bezvodá (ledová) kyselina octová	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Přidejte vodu do objemu 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaróza 3:1

3 díly agarózy NuSieve™ GTG™

1 díl agarózy Fisher s nízkou elektroendosmózou (EEO)

Metoda

1. Připravte 3 % gel přidáním 1,2 g směsi agarózy do 43 ml 1X TAE. Protřepte, aby se rozptýlily velké shluky.

2. Směs agarózy ohřívejte v mikrovlnce, dokud se zcela nerozpustí (nesmí se převařit). Nechte trochu vychladit.

3. Přidejte 1,0 µl ethidiumbromidu (10 mg/ml). Láhev protřepte. Nezapomeňte, že ethidiumbromid je mutagenní, proto by měly být pro tento krok použity alternativní chemické látky, pokud je to technicky možné, aby se minimalizovala zdravotní rizika pro pracovníky ([2]).

4. Nalijte gel do formy s hřebenem. Nechte ho zcela vychladnout.

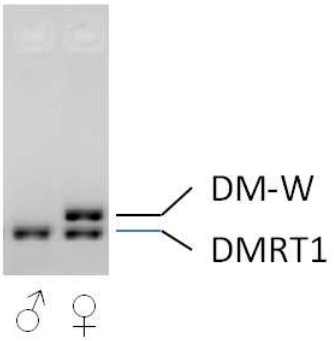
5. Přidejte gel do přístroje. Gel pokryjte 1X TAE.

6. Přidejte 1 µl 6x zaváděcího barviva do každého produktu PCR o objemu 10 µl.

7. Vzorky napipetujte do jamek.

8. Zpracujte při konstantním napětí 160 V po dobu ~ 20 minut.

Na **obrázku 1** je zobrazení agarózového gelu znázorňující vzory pruhů, které ukazují samčí a samičí jedince.



Obrázek 1: Zobrazení agarózového gelu znázorňující vzor pruhů, které ukazují samčí (♂) jedince (jeden pruh ~ 203 bp: DMRT1) a samičí (♀) jedince (dva pruhy při ~ 259 bp: DM-W a 203 bp:DMRT1).

LITERATURA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

([2]) V souladu s čl. 4 odst. 1 směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/37/ES ze dne 29. dubna 2004 o ochraně zaměstnanců před riziky spojenými s expozicí karcinogenům nebo mutagenům při práci (šestá samostatná směrnice ve smyslu čl. 16 odst. 1 směrnice 89/391/EHS) (Úř. věst. L 158, 30.4.2004, s. 50).

Dodatek 6

MĚŘENÍ VITELOGENINU

Měření vitelogeninu (VTG) se provádí pomocí metody enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), která byla původně vyvinuta pro VTG jelečka velkohlavého (Parks *et al.*, 1999). V současnosti neexistují žádné komerčně dostupné protilátky pro *X. laevis*. Vzhledem k velkému množství informací o této bílkovině a dostupnosti nákladově efektivních služeb komerční produkce protilátek lze předpokládat, že laboratoře si mohou snadno vyvinout test ELISA pro toto měření (Olmstead *et al.*, 2009). V publikaci Olmstead *et al.* (2009) je také uveden popis analýzy upravený pro VTG u *X. tropicalis*, jak je ukázáno níže. Metoda používá protilátku připravenou proti VTG *X. tropicalis*, ale je známo, že funguje také na VTG *X. laevis*. Je třeba poznamenat, že mohou být použity i nekompetitivní testy ELISA a že tyto testy mohou mít nižší detekční limity než metoda popsaná níže.

Materiál a reakční činidla

— Předadsorbované sérum s 1. protilátkou (Ab)

— Smíchejte jeden díl séra 1. Ab anti-*X. tropicalis* VTG s 2 díly kontrolní samčí plazmy a nechte při pokojové teplotě po dobu ~ 75 minut, položte na led na dobu 30 minut, odstřeďujte > 20K x G po dobu 1 hodiny při 4 °C, odstraňte supernatant, alikvotní množství, uchovávejte při –20 °C.

— 2. protilátka

— Konjugát kozí proti-králičí IgG-HRP (např. Bio-Rad 172-1019)

— VTG Standard

— purifikovaný VTG *X. laevis* v koncentraci 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidin) (např. KPL 50-76-00; nebo Sigma T0440)

— Normální kozí sérum (NGS)(např. Chemicon® S26-100ml)

— 96jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky EIA (např. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Hybridizační komora 37 °C (nebo vzduchový inkubátor s rychlým dosažením rovnovážného stavu) na destičky, vodní lázeň na zkumavky

— Další běžné laboratorní vybavení, chemikálie a spotřební materiál.

Předpisy

Nanášecí pufr (50 mM karbonátového pufru, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

Promývací pufr (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 přidáním 1 M HCl, poté přidejte 0,5 ml Tween-20.

Zkušební pufr:

Normální kozí sérum (NGS)	3,75 ml
Promývací pufr	146,25 ml

Odběr vzorků

Krev se odebírá heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou a umístí na led. Po odstřeďování po dobu 3 minut se kapilára nařízne, rozlomí a plazma se vystříkne do mikrozkumavek o objemu 0,6 ml, které obsahují 0,13 jednotek lyofilizovaného aprotininu. (Tyto zkumavky se připraví předem přidáním příslušného množství aprotininu, zmrazením a lyofilizováním v odparce při nízké teplotě až do vysušení.) Plasma uchovávejte při teplotě −80 °C až do analýzy.

Postup pro jednu destičku

Nanášení na destičku

Smíchejte 20 µl purifikovaného VTG s 22 ml karbonátového pufru (konečná koncentrace 3 µg/ml). Přidejte 200 µl do každé jamky 96- jamkové destičky. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4 °C přes noc).

Zastavení reakce na destičce

Tlumivý roztok se připraví přidáním 2 ml normálního kozího séra (NGS) do 38 ml karbonátového pufru. Odstraňte nanášecí roztok a otřepte dosucha. Do každé jamky přidejte 350 µl tlumivého roztoku. Zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4°C přes noc).

Příprava standardů

5,8 µl purifikovaného VTG se smíchá s 1,5 ml zkušebního pufru v jednorázové zkumavce z borokřemičitého skla 12 x 75 mm. Vznikne tak 12 760 ng/ml. Poté se provede postupné ředění přidáním 750 µl předchozího naředěného roztoku do 750 µl zkušebního pufru, čímž vzniknou konečné koncentrace 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Příprava vzorků

Začněte roztokem plazmy ve zkušebním pufru 1: 300 (např. smíchejte 1 µl plazmy s 299 µl zkušebního pufru) nebo 1: 30. Jestliže očekáváte velké množství VTG, mohou být potřebná další ředění nebo větší ředění. Snažte se udržovat B/B_o v rozmezí standardů. U vzorků bez hodnotitelného VTG, např. kontrolní samečci a samičky (všechny nezralé), použijte ředění 1: 30. Vzorky naředěné méně, než je uvedeno, mohou vykazovat nechtěné matricové jevy.

Dále se doporučuje provést na každé destičce pozitivní kontrolní vzorek. Tento vzorek pochází ze zásoby plazmy obsahující vysoce indukované hladiny VTG. Zásoba se nejprve naředí v NGS, rozdělí se na poměrné díly a uchovává se při −80 °C. Pro každou destičku se rozmrazí poměrný díl, dále se naředí ve zkušebním pufru a použije se podobně jako zkušební vzorek.

Inkubace s 1. protilátkou

1. protilátka se připraví zhotovením zředěného roztoku 1: 2000 předadsorbovaného séra s 1. protilátkou ve zkušebním pufru (např. 8 µl v 16 ml zkušebního pufru). Smíchejte 300 µl roztoku 1. protilátky s 300 µl vzorku/standardu ve skleněné zkumavce. Zkumavka B_o se připraví podobně s 300 µl zkušebního pufru a 300 µl protilátky. Rovněž se připraví zkumavka NSB pouze s 600 µl zkušebního pufru, tj. bez protilátky. Zkumavky zakryjte fólií Parafilm a lehce promíchejte. Inkubujte ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Promytí destičky

Bezprostředně před dokončením inkubace 1. protilátky destičku promyjte. Provádí se to vytřepáním obsahu a oklepáním dosucha na savém papíru. Poté jamky naplňte 350 µl promývacího roztoku, vylijte jej a oklepte dosucha. Zde je užitečná více-kanálová pipeta nebo promývačka destiček. Promývání se zopakuje ještě dvakrát, aby se destička promyla celkem třikrát.

Nanášení vzorku na destičku

Po promytí destičky vyjměte zkumavky z vodní lázně a lehce je promíchejte. Přidejte 200 µl z každého vzorku, standardu, B_o a zkumavky NSB, aby byly jamky na destičce duplikovány. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Inkubace s 2. protilátkou

Na konci inkubace z předchozího kroku se destička opět třikrát promyje, jak je uvedeno výše. Naředěná 2. protilátka se připraví smícháním 2,5 µl 2. protilátky s 50 ml zkušebního pufru. Do každé jamky se přidá 200 µl naředěné 2. protilátky, destička se zakryje, jak je uvedeno výše a inkubuje se po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C.

Přidání substrátu

Po dokončení inkubace s 2. protilátkou destičku třikrát promyjte, jak je popsáno výše. Poté do každé jamky přidejte 100 µl substrátu TMB. Nechte reakci probíhat 10 minut, nejlépe mimo jasné světlo. Reakci zastavte přidáním 100 µl kyseliny fosforečné 1 M. Změní to barvu z modré na intenzivně žlutou. Pomocí čtečky změřte absorbanci při 450 nm.

Výpočet B/B_o

Odečtěte průměrnou hodnotu NSB od všech měření. B/B_o pro každý vzorek a standard se vypočítá vydělením hodnoty absorbance (B) průměrnou absorbancí vzorku B_o.

Zjištění standardní křivky a stanovení neznámých množství

Pomocí některého grafického softwaru (např. Slidewrite™ nebo Sigma Plot®) vygenerujte standardní křivku, která bude extrapolovat množství ze vzorku B/B_o podle standardů B/B_o. Obvykle je množství vyneseno na logaritmické stupnici a křivka má sigmoidní tvar. Při použití úzkého rozmezí standardů však může vypadat lineárně. Korigujte množství vzorku podle faktoru ředění a uveďte je v mg VTG/ml plazmy.

Určení minimálních mezí stanovitelnosti (MDL)

Zejména u normálních samečků je často nejasné, jak se mají vykazovat výsledky z nízkých hodnot. V takových případech je třeba použít 95 % „konfidenční interval" pro stanovení, zda má být hodnota vykázána jako nula, nebo jako nějaké jiné číslo. Jestliže je výsledek vzorku v rámci intervalu spolehlivosti nulového standardu (B_0), výsledek se vykazuje jako nula. Minimální úrovní detekce bude nejnižší standard, který je konzistentně odlišný od nulového standardu; to znamená, že se dva konfidenční intervaly nepřekrývají. Pro každý výsledek vzorku, který je v rámci konfidenčního intervalu minimální úrovně detekce nebo nad ní, se vykáže vypočtená hodnota. Jestliže vzorek spadá mezi intervaly nulového standardu a konfidenční intervaly minimální úrovně detekce, vykáže se polovina minimální úrovně detekce pro hodnotu tohoto vzorku.

LITERATURA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Dodatek 7

STATISTICKÁ ANALÝZA

Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data, 2) data o době do události u vývojových podílů (doba do stádia NF 62) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření. Doporučené rozhodovací schéma statistické analýzy pro zkoušku LAGDA je uvedeno na obrázku 1. Níže jsou uvedeny také některé anotace, jež mohou být potřebné k provedení statistické analýzy pro měření ze zkoušky LAGDA. Pro rozhodovací schéma analýzy je třeba analyzovat výsledky měření mortality, růstu (hmotnost a délka) a jaterního somatického indexu (LSI) podle větve „jiné sledované parametry".

Kontinuální data

Nejprve je třeba transformovat pořadí dat a zkontrolovat tak, zda jsou data u kontinuálních sledovaných parametrů monotónní, nanést je do modelu ANOVA a porovnat lineární a kvadratické kontrasty. Jestliže data jsou monotónní, je třeba provést Jonckheerův-Terpstrův trend test na mediánech replikátů, přičemž se neprovádějí žádné další analýzy. Alternativou pro data, která jsou normálně distribuována s homogenními rozptyly, je sestupný Williamsův test. Jestliže data nejsou monotónní (kvadratický kontrast je významný a lineární není významný), je třeba je analyzovat pomocí modelu ANOVA se smíšenými účinky. Údaje by poté měly být posouzeny z hlediska normality rozdělení (pokud možno Shapiro-Wilkovým nebo Anderson-Darlingovým testem) a homogenity rozptylu (pokud možno Levenovým testem). Oba testy se provádějí na základě reziduálních hodnot získaných z modelu ANOVA se smíšenými účinky. Místo těchto formálních testů na normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze použít odborný posudek, ovšem formální testy se upřednostňují. Jestliže jsou data normálně distribuována s homogenním rozptylem, jsou splněny předpoklady modelu ANOVA se smíšenými účinky a významný účinek expozice se stanoví Dunnettovým testem. Pokud je zjištěno nenormální rozdělení nebo heterogenní rozptyl, pak jsou porušeny předpoklady Dunnettova testu a je třeba hledat normalizační transformaci ke stabilizaci rozptylu. Jestliže žádná taková transformace není nalezena, stanoví se významný účinek expozice Dunnovým testem. Pokud je to možné, provádí se jednostranný test místo oboustranného, ale stanovení, který test je pro daný sledovaný parametr vhodný, vyžaduje odborné posouzení.

Mortalita

U dat o mortalitě se analyzuje časové období zahrnující celou zkoušku a mortalita se vyjadřuje jako podíl uhynulých jedinců v každé konkrétní nádrži. Pulci, kteří nedokončí metamorfózu v daném časovém rámci, pulci, kteří jsou v kohortě larválního dílčího vzorku, juvenilní žáby, které jsou redukovány, a všechna zvířata uhynulá v důsledku chyby experimentátora se považují za cenzurovaná data a nezařazují se do jmenovatele při výpočtu procenta. Před jakoukoli statistickou analýzou je třeba podíly mortality transformovat druhou odmocninou funkce arcsin. Alternativně lze použít sestupný Cochranův-Armitageův test, případně s Raovou-Scottovou korekcí při nadměrném rozptylu.

Hmotnost a délka (údaje o růstu)

Samečci a samičky nejsou v průběhu metamorfózy pohlavně dimorfní, proto se údaje o růstu z dílčího vzorku z larválního stádia analyzují nezávisle na pohlaví. Údaje o růstu z juvenilního stádia se však analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Pro tyto sledované parametry může být nutné provést logaritmickou transformaci, protože logaritmická normalita dat o velikosti není neobvyklá.

Jaterní somatický index (LSI)

Hmotnosti jater je třeba normalizovat jako podíly z hmotností celého těla (tj. LSI) a analyzovat zvlášť podle genetického pohlaví.

Doba do stádia NF 62

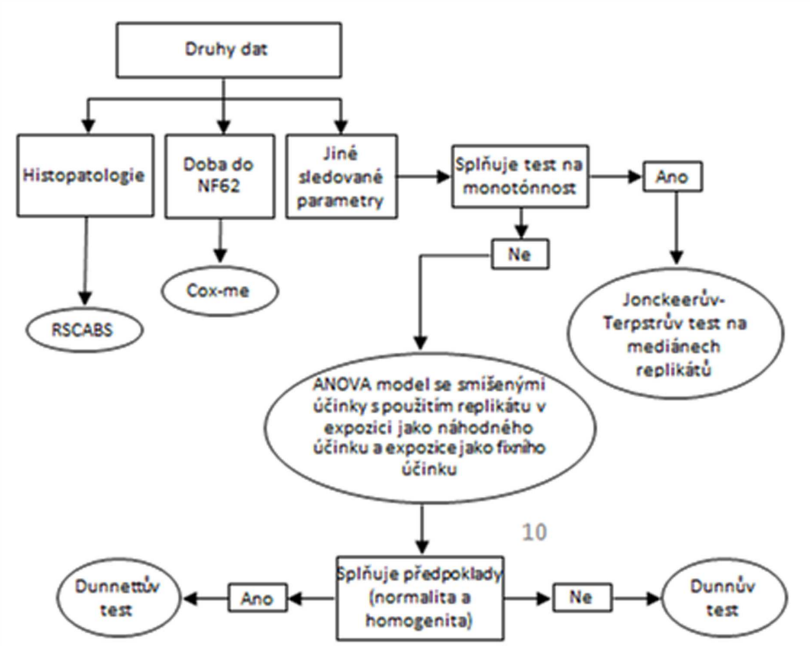
Údaje o době do metamorfózy se považují za data o času do události, přičemž mortality nebo jednotlivci, kteří nedosáhli stádia NF 62 do 70 dnů, se považují za vpravo cenzurovaná data (tj. skutečná hodnota je větší než 70 dnů, ale studie končí dříve, než zvířata dosáhla stadia NF 62 do 70 dnů). K určení data ukončení zkoušky by se měla použít střední doba do stádia NF 62 dokončení metamorfózy v kontrolách s ředicí vodou. Střední doba do dokončení metamorfózy by mohla být určena podle Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití. Tento cílový parametr by se měl analyzovat pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků, který zohledňuje replikátovou strukturu studie.

Histopatologické údaje (stupně závažnosti a vývojová stádia)

Histopatologické údaje jsou ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií. Test s názvem RSCABS (Rao-Scottův, Cochranův-Armitagův testu využívající dílčí testy) používá sestupný Cochranův-Armitagův trend test s korekcí podle Rao-Scotta na každé úrovni závažnosti histopatologické odpovědi (Green *et al.*, 2014). Korekce podle Rao-Scotta začleňuje do testu uspořádání experimentu formou replikátových nádob. Postup „využívající dílčí testy" zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice, přičemž budou uchovávat stupně jednotlivých subjektů a odhalovat závažnost jakéhokoli zjištěného účinku. Postup RSCABS určuje nejen, jaké expozice jsou statisticky odlišné od kontrol (tj. mají závažnější patologii než kontroly), ale určuje také, na jakém stupni závažnosti k rozdílu dochází, čímž poskytuje velmi potřebný rámec analýzy. V případě určování vývojového stádia gonád a reprodukčního traktu je třeba na data aplikovat další manipulaci, protože předpoklad testu RSCABS je, že závažnost účinku se zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinek může být opoždění nebo urychlení vývoje. Proto je třeba data o vývojovém stádiu analyzovat tak, jak jsou uvedena, aby bylo možné detekovat urychlení vývoje, a poté je před druhou analýzou manuálně invertovat, aby bylo možné detekovat opoždění vývoje.

Obrázek 1

Rozhodovací schéma statistické analýzy pro data LAGDA.



LITERATURA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

Dodatek 8

POZNÁMKY KE SLEDOVÁNÍ A MINIMALIZACI VZNIKU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, projevující se u pulců *Xenopus laevis* obvykle jako zahnutý ocas, může komplikovat morfologické pozorování a pozorování chování ve zkušebních populacích. Je třeba usilovat o minimalizaci nebo eliminaci výskytu skoliózy, a to jak v zásobní populaci, tak i ve zkušebních podmínkách. Při definitivním testu se doporučuje, aby byla prevalence střední a těžké skoliózy menší než 10 %, aby se zlepšila spolehlivost, že test dokáže detekovat vývojové účinky závislé na expozici u jinak zdravých larev obojživelníků.

Při denních pozorováních v průběhu definitivního testu je třeba zaznamenávat výskyt (jednotlivý počet) i závažnost skoliózy, je-li zjištěna. Je třeba popsat povahu abnormality s ohledem na umístění (např. před kloakou nebo za kloakou) a směr zakřivení (např. laterální nebo dorzálně ventrální). Závažnost může být odstupňována takto:

(NR) Nenápadné: žádné zakřivení

1) Minimální: mírné laterální zakřivení za kloakou; zjevné pouze v klidu

2) Střední: laterální zakřivení za kloakou; viditelné vždy, ale neinhibuje pohyb

3) Těžké: laterální zakřivení před kloakou; NEBO jakékoli zakřivení, které inhibuje pohyb; NEBO jakékoli dorzálně ventrální zakřivení

Americký vědecký poradní panel EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) provedl revizi souhrnných dat o skolióze v patnácti analýzách metamorfózy obojživelníků s *X. laevis* (stádium NF 51 až 60+) a stanovil obecná doporučení pro redukci prevalence této abnormality ve zkušebních populacích. Doporučení jsou relevantní pro analýzu LAGDA, i když tato zkouška zahrnuje delší vývojovou časovou řadu.

Historická výkonnost tření

Obecně by se jako chovné páry měli používat kvalitní, zdraví dospělí jedinci; eliminace chovných párů, které produkují potomstvo se skoliózou, může minimalizovat její výskyt v čase. Přínosná může být zejména minimalizace používání chovné populace odlovené v přírodě. Expoziční doba ve zkoušce LAGDA začíná stádiem NF 8 až 10 embryí a není prakticky možné stanovit při zahájení zkoušky, zda budou daní jednotlivci jevit známky skoliózy. Kromě sledování incidence skoliózy u zvířat, která jsou zařazena do zkoušky, je proto třeba zadokumentovat také historickou výkonnost snůšky (včetně prevalence skoliózy u všech larev ponechaný ve vývoji). Může být užitečné dále monitorovat část každé snůšky nepoužitou v dané studii a uvést tato pozorování (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Důležité je zajistit adekvátní kvalitu vody, a to jak v laboratorním zásobním chovu, tak i v průběhu zkoušky. Kromě kritérií kvality vody rutinně hodnocených při zkouškách vodní toxicity může být užitečné monitorovat a korigovat případné deficity živin (např. deficit vitamínu C, vápníku, fosforu) nebo nadměrné hladiny selenu a mědi, o nichž se uvádí, že u laboratorně chovaných druhů *Rana* sp. a *Xenopus* sp. působí skoliózu různého stupně (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; jak se uvádí v publikaci FIFRA SAP 2013). Použití vhodného krmného režimu (viz dodatek 4) a pravidelné čištění nádrže obvykle zlepší kvalitu vody a zdraví pokusných druhů.

Potrava

Konkrétní doporučení pro krmný režim, o němž bylo zjištěno, že je ve zkoušce LAGDA úspěšný, jsou podrobně uvedena v dodatku 4. Doporučuje se prověřovat zdroje krmiva, zda neobsahují toxiny, herbicidy a jiné pesticidy, o nichž je známo, že u druhů *X. laevis* nebo jiných vodních živočichů působí skoliózu (Schlenk and Jenkins 2013). Například expozice některým inhibitorům cholinesterázy souvisí se skoliózou u ryb (Schultz *et al.* 1985) a žab (Bacchetta *et al.* 2008).

LITERATURA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.“