

II

(Nelegislativní akty)

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 900/2014

ze dne 15. července 2014,

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

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnice 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 určování fyzikálně-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity chemických látek, které se mají používat pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006.
- (2) Nařízení (ES) č. 440/2008 je třeba aktualizovat a přednostně do něj zahrnout nové a aktualizované zkušební metody, jež nedávno schválila OECD, aby byl zohledněn technický pokrok a v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ⁽³⁾ došlo ke snížení počtu zvířat používaných pro pokusné účely. Se zúčastněnými stranami byla tato předloha konzultována.
- (3) Toto přizpůsobování technickému pokroku obsahuje šest nových zkušebních metod pro stanovení toxicity a jiných účinků na zdraví včetně studie vývojové neurotoxicity, rozšířené jednogenerační studie reprodukční toxicity, transgenního *in vivo* testu genové mutace na hlodavcích, testu *in vitro* s cílem posoudit účinky na syntézu steroidních hormonů, jakož i dvou metod *in vivo* pro posouzení estrogenních a (anti) androgenních účinků.
- (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,

⁽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, Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33).

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

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

Článek 2

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

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

V Bruselu dne 15. července 2014.

Za Komisi
José Manuel BARROSO
předseda

PŘÍLOHA

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

Vkládají se kapitoly B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 a B.58, které znějí:

„B.53. STUDIE VÝVOJOVÉ NEUROTOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 426 (2007). Pracovní skupina OECD pro reprodukční a vývojovou toxicitu na svém zasedání v červnu 1995 v Kodani jednala o potřebě aktualizovat stávající pokyny OECD pro zkoušení reprodukční a vývojové toxicity a vypracovat nové pokyny pro účinky, pro které pokyny ještě neexistují (1). Pracovní skupina doporučila, aby pokyn pro zkoušení vývojové neurotoxicity byl vypracován na základě pokynu Úřadu pro ochranu životního prostředí USA (US EPA), který byl později revidován (2). V červnu 1996 se v Kodani konala druhá konzultační schůzka, která poskytla sekretariátu doporučení k nástupu nového pokynu pro zkoušení vývojové neurotoxicity, včetně jejich hlavních prvků, např. podrobností týkajících se volby druhu zvířat, období podávání dávek, doby zkoušky, výsledných parametrů, které mají být posuzovány, a kritérií pro hodnocení výsledků. V roce 1998 byl zveřejněn pokyn USA pro posuzování rizik neurotoxicity (3). V říjnu 2000 se konala konzultační schůzka odborníků OECD, na kterou bezprostředně navázal seminář vědeckého ústavu pro výzkum rizik ILSI, a v roce 2005 se uskutečnila konzultační schůzka odborníků v Tokiu. Cílem těchto zasedání bylo projednat vědecké a technické otázky související se stávajícím pokynem pro zkoušení a doporučení, jež z těchto zasedání vzešla (4)(5)(6)(7), byla zvážena při vývoji této zkušební metody. Další informace týkající se provádění, interpretace a použité terminologie této zkušební metody lze najít v Pokynu OECD č. 43 ‚Zkoušení a posuzování reprodukční toxicity‘ (8) a Pokynu OECD č. 20 ‚Zkoušení neurotoxicity‘ (9).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. Je známo, že některé chemické látky mají vývojové neurotoxické účinky na člověka a další druhy (10)(11)(12)(13). Aby bylo možno posoudit a zhodnotit toxické vlastnosti určité chemické látky, může být nutné stanovit, jaká je její schopnost vývojové neurotoxicity. Studie vývojové neurotoxicity jsou koncipovány s cílem poskytnout údaje, včetně charakterizace vztahu dávka-odpověď, o možných funkčních a morfologických účincích na vývoj nervové soustavy potomstva, jež mohou vzniknout v důsledku expozice *in utero* a v časném postnatálním období života.
3. Studii vývojové neurotoxicity lze provádět jako samostatnou studii, začlenit ji do studie reprodukční toxicity a/nebo neurotoxicity dospělých zvířat (např. zkušební metody B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) nebo ji připojit ke studii prenatální vývojové toxicity (např. zkušební metoda B.31 (17)). Je-li studie vývojové neurotoxicity začleněna do jiné studie nebo připojena k jiné studii, musí být bezpodmínečně zachována integrita obou typů studií. Všechny zkoušky musí splňovat platné právní předpisy nebo státní a institucionální pokyny pro používání laboratorních zvířat ve výzkumu (např. (18)).
4. Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce. Součástí těchto informací je totožnost a struktura chemické látky, její fyzické a chemické vlastnosti, výsledky jiných zkoušek toxicity dané chemické látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách a očekávané použití chemické látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

PODSTATA ZKOUŠKY

5. Zkoušená chemická látka se podává zvířatům v době březosti a laktace. Jsou testovány matky za účelem posouzení účinků na březí a kojící samice a zkouška může také poskytnout informace pro srovnání (mezi matkou a potomstvem). Z vrhů se náhodně vybere potomstvo pro hodnocení neurotoxicity. Hodnocení se skládá z pozorování za účelem zjištění závažných neurologických abnormalit a abnormalit v chování, včetně posouzení fyzického vývoje, behaviorální ontogeneze, motorické aktivity, motorických a smyslových funkcí a učení a paměti; a hodnocení hmotností mozku a neuropatologie během postnatálního vývoje a v dospělosti.

6. Pokud se zkušební metoda provádí jako samostatná studie, lze další dostupná zvířata z každé skupiny použít pro specifická neurobehaviorální, neuropatologická, neurochemická nebo elektrofyziologická vyšetření, která mohou doplnit údaje získané z vyšetření doporučených touto zkušební metodou (16)(19)(20)(21). Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, pokud empirické pozorování, očekávané účinky nebo mechanismus účinku ukazují na specifický typ neurotoxicity. Tyto doplňující postupy lze použít na matkách i na mláďatech. Kromě toho lze použít také postupů *ex vivo* nebo *in vitro*, pokud tyto zkoušky nezmění integritu postupů *in vivo*.

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU

Výběr druhu zvířat

7. Upřednostňovaným zkušebním druhem je potkan; případně lze použít i jiné druhy. Je však třeba mít na paměti, že období březosti a období postnatálního vývoje stanovené v této zkušební metodě jsou specifické pro běžně užívané kmeny potkanů, a pokud jsou použity jiné druhy nebo neobvyklé kmeny, měla by být zvolena srovnatelná období. Použití jiných druhů by mělo být zdůvodněno na základě toxikologických, farmakokinetických a/nebo jiných údajů. Zdůvodnění by mělo obsahovat dostupné postnatální neurobehaviorální a neuropatologické hodnocení specifické pro daný druh. Jestliže existuje dřívější zkouška, která vyvolala pozornost, mělo by být zváženo, na kterém druhu/kmenu byla provedena. Vzhledem k různým reakcím jednotlivých kmenů potkanů by měly existovat důkazy o tom, že kmen zvolený k použití má přiměřenou plodnost a citlivost. Spolehlivost a citlivost jiných druhů pro účely zjišťování vývojové neurotoxicity by měly být zdokumentovány.

Podmínky chovu a krmení

8. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C ($\pm$ 3 °C). Relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti; avšak cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Před pářením a po dobu trvání studie lze rovněž světelný cyklus obrátit, aby bylo možné posoudit sledované funkční a behaviorální vlastnosti za tmy (pod červeným světlem), tj. v době, kdy jsou zvířata za běžných podmínek aktivní (22). Veškeré změny v rytmu světla a tmy by měly zahrnovat přiměřenou dobu na aklimatizaci, aby se zvířatům umožnilo přizpůsobit se novému rytmu. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dávkou pitné vody. Druhy krmiva a vody by měly být zaznamenány a měly by být analyzovány na přítomnost kontaminujících látek.
9. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo je umístit do klecí v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po spáření nebo nejpozději v 15. den březosti by oplodněné samice měly být umístěny individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. S blížící se dobou vrhu by oplodněným samicím měl být poskytnut odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres v době březosti může vést k nepříznivým následkům, včetně prenatální ztráty a změněného vývoje plodu a postnatálního vývoje. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nesouvisí s expozicí, by se mělo se zvířaty během březosti zacházet opatrně a zamezit stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. nadměrný vnější hluk.

Příprava zvířat

10. Použijí se zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům, pokud není studie začleněna do jiné studie (viz odstavec 3). Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Každému zvířeti by mělo být přiděleno jedinečné identifikační číslo a zvíře by jím mělo být označeno. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk a měla by být v rámci normálního rozpětí zkoumaného druhu a kmene. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které musí být nulipary. Je třeba dbát na to, aby nedocházelo k páření sourozenců. Nultým dnem gestace je den, kdy je zpozorována vaginální zátka a/nebo sperma. Jsou-li od dodavatele nakupována stejně dlouho březí zvířata, měla by jim být poskytnuta přiměřená doba (např. 2–3 dny) na aklimatizaci. Oplodněné samice se náhodným výběrem přidělí do kontrolních a experimentálních skupin a měly by být do skupin rozděleny pokud možno rovnoměrně (pro zajištění rovnoměrného rozdělení do všech skupin se doporučuje např. postup stratifikovaného náhodného výběru, jako je postup založený na tělesné hmotnosti). Samice oplodněné stejným samcem by měly být rovnoměrně rozděleny do všech skupin.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

11. V každé zkušební a kontrolní skupině by měl být dostatečný počet březích samic, které budou exponovány zkoušené chemické látce, aby se zajistilo, že se narodí dostatečný počet potomků pro hodnocení neurotoxicity. Pro každou úroveň dávky se doporučuje použít celkem 20 vrhů. Jsou povoleny režimy s opakovaným a stupňovitým podáváním, pokud je dosažen celkový počet vrhů v každé skupině a pokud jsou použity vhodné statistické metody zohledňující opakování.
12. Ve 4. postnatální den nebo dříve (postnatální den 0 je den vrhu) musí být velikost každého vrhu upravena odstraněním nadbytečných mláďat, aby byla dosažena stejná velikost všech vrhů (3). Velikost vrhu by neměla přesahovat průměrnou velikost vrhu u použitého kmene hlodavců (8–12 mláďat). Ve vrhu by měl být pokud možno stejný počet mladých samců a samic. Selektivní odstraňování mláďat, např. na základě tělesné hmotnosti, není vhodné. Po standardizaci velikosti vrhů (utracení) a před dalším zkoušením sledovaných funkčních ukazatelů by jednotlivá mláďata, která jsou určena pro zkoušky před odstavením a po odstavení, měla být jednoznačně identifikována pomocí jakékoli vhodné humánní metody pro identifikaci mláďat (např. (24)).

Přiřazení zvířat pro funkční a behaviorální zkoušky, hmotnost mozků a neuropatologická hodnocení

13. Tato zkušební metoda umožňuje různé způsoby přiřazení zvířat exponovaných *in utero* a prostřednictvím laktace pro funkční a behaviorální zkoušky, určení pohlavní zralosti, stanovení váhy mozku a neuropatologické hodnocení (25). V jednotlivých případech lze přidat i jiné zkoušky neurobehaviorálních funkcí (např. sociálního chování), neurochemie nebo neuropatologie, pokud nebude ohrožena integrita původně požadovaných zkoušek.
14. Z každé exponované skupiny se ve 4. postnatální den nebo později vyberou mláďata a přiřadí se pro posouzení sledovaných vlastností. Výběr mláďat by měl být prováděn tak, aby při všech zkouškách byla v každé exponované skupině v největším možném rozsahu rovnoměrně zastoupena obě pohlaví z každého vrhu. Pro zkoušky motorické aktivity by měla být použita stejná dvojice mláďat samec-samice v každém zkoumaném věku před odstavením (viz odstavec 35). Pro všechny ostatní zkoušky lze pro různé behaviorální zkoušky použít tytéž páry mláďat nebo páry různé pro každou zkoušku. Pro zkoušky poznávacích funkcí odstavených mláďat v porovnání s dospělými zvířaty bude možná nutné přiřadit odlišná mláďata, aby se zamezilo zkreslujícím účinkům věku a předchozího návyku na tato měření (26)(27). Při odstavení (21. postnatální den) lze mláďata, která nebyla vybrána ke zkouškám, humánně usmrtit. Veškeré změny v přiřazení mláďat musí být zaznamenány. Statistickou jednotkou pro vyhodnocování výsledků by měl být vrh (nebo samice), a nikoli mláďe.
15. Existují různé způsoby přiřazování mláďat k vyšetřením před odstavením a po odstavení, zkouškám poznávacích schopností, patologickým vyšetřením atd. (o obecném konceptu viz obrázek 1 a příklady přiřazení viz dodatek 1). Doporučené minimální počty zvířat v každé exponované skupině pro vyšetření před odstavením a po odstavení jsou tyto:

Klinická pozorování a tělesná hmotnost	Všechna zvířata
Podrobná klinická pozorování	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Hmotnost mozku (po fixaci) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Hmotnost mozku (nefixovaného) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace ponořením do fixačního roztoku nebo perfuzí) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace perfuzí) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)

Pohlavní zralost	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Jiné vývojové znaky (není povinné)	Všechna zvířata
Behaviorální ontogeneze	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorická aktivita	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorické a smyslové funkce	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Učení a paměť	10 od každého pohlaví ^(a) (1 z každého vrhu)

(^a) V závislosti na citlivosti zkoušek poznávacích funkcí by mělo být zváženo vyšetření mnohem většího počtu zvířat, např. až 1 samce a 1 samice z každého vrhu (o přiřazení zvířat viz dodatek 1) (další pokyny týkající se velikosti vzorku obsahuje Pokyn OECD č. 43 (8)).

Dávkování

16. Použijí se alespoň tři dávky a souběžná kontrolní skupina. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení vyplývající z fyzikálně-chemické podstaty nebo biologických vlastností chemické látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou toxicitu u březí samice (např. klinické znaky, snížení přírůstku tělesné hmotnosti (ne více než o 10 %) a/nebo projevy limitní toxicity dávky pro cílový orgán). Nejvyšší dávku lze s určitými výjimkami omezit na 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den. Avšak například velikost očekávané expozice člověka může vyvolat potřebu použití vyšší dávky. Jinak by měly být provedeny předběžné studie nebo předběžné orientační zkoušky s cílem určit, jaké nejvyšší dávkování má být použito, aby způsobilo minimální stupeň toxicity pro matku. Pokud se ve standardní studii vývojové toxicity nebo v předběžné studii ukázalo, že zkoušená chemická látka je vývojově toxická, měla by nejvyšší úrovní dávky být maximální dávka, která nevyvolá nadměrnou toxicitu pro potomstvo, nebo toxicitu *in utero* nebo neonatální toxicitu, popřípadě malformace v míře znemožňující provést smysluplné hodnocení neurotoxicity. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity pro matku ani žádné známky vývojové toxicity, včetně neurotoxicity. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL) nebo by měly být použity dávky blízké se mezi detekovatelnosti, které by umožnily stanovení referenční dávky. Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou exponovanou skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 10) mezi dávkami.
17. Při výběru dávek je třeba brát v úvahu veškeré existující údaje o toxicitě a také další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené chemické látky nebo látek příbuzných. Tyto informace mohou rovněž pomoci při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu. Přímé podávání mláďatům by mělo být zváženo na základě informací o expozici a farmakokinetických informací (28)(29). Před prováděním studií s přímým dávkováním by měly být pečlivě zváženy přínosy a nevýhody (30).
18. Souběžnou kontrolní skupinou by měla být kontrolní skupina s napodobeným podáváním nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené chemické látky používá. Normálně by měl být všem zvířatům podáván stejný objem zkoušené chemické látky nebo vehikula na základě tělesné hmotnosti. Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující možnosti: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou ovlivnit její toxický účinek, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo na nutriční stav zvířat. Vehikulum by nemělo vyvolávat účinky, které by mohly ovlivnit interpretaci studie, nemělo by být neurobehaviorálně toxické a nemělo by mít vliv na rozmnožování nebo vývoj. V případě nových vehikul by kromě kontrolní skupiny s vehikulem měla být zařazena také kontrolní skupina s napodobeným podáváním. Se zvířaty v kontrolní skupině (skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině.

Podávání dávek

19. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány cestami nejvhodnějšími z hlediska potenciální expozice člověka a na základě dostupných informací o metabolismu a distribuci u zkušebních zvířat. Podávány budou zpravidla orální cestou (např. sondou nebo v potravě či v pitné vodě), ale lze použít i jiné cesty (např. dermální expozici, inhalaci) v závislosti na vlastnostech a očekávaných nebo známých způsobech expozice člověka (další pokyny jsou uvedeny v Pokynu OECD č. 43 (8)). Zvolený způsob podávání je třeba zdůvodnit. Zkoušená chemická látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.
20. Obvykle by dávka podávaná jednotlivým zvířatům měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti. Pokud je u experimentálních samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí.
21. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány oplodněným samicím nejméně jednou denně od doby implantace (6. den gestace) po celé období laktace (21. postnatální den), takže mláďata jsou zkoušené chemické látky exponována během prenatálního i postnatálního neurologického vývoje. Věk, ve kterém se začne dávka podávat, a trvání a frekvenci podávání dávky lze upravit, pokud existují poznatky, že jiné experimentální uspořádání je vhodnější z hlediska expozice člověka. Pro jiné druhy je podávání dávek nutno přizpůsobit tak, aby se zajistila expozice během všech raných období vývoje mozku (tj. odpovídajících prenatálnímu a raně postnatálnímu růstu lidského mozku). Podávání dávek může začít od vyvolání březosti (nultý den gestace), avšak měla by být zvážena schopnost zkoušené chemické látky způsobit preimplantační ztráty. Podávání od 6. dne gestace by toto riziko vyloučilo, ale nebyla by podchycena stadia vývoje mezi nultým a 6. dnem gestace. Jestliže laboratoř nakupuje zvířata spářená ve stejnou dobu, začínat podávání dávky v nultý den gestace je nepraktické, a vhodným počátečním dnem by proto byl 6. den gestace. Zkušební laboratoř by měla stanovit režim dávkování na základě příslušných informací o účincích zkoušené chemické látky, předchozích zkušeností a s ohledem na logistické zajištění; to může zahrnovat prodloužení podávání dávek po odstavení. Dávky by neměly být podávány v den vrhu těm zvířatům, která nevrhla celé své potomstvo. Obecně se předpokládá, že k expozici mláďat dojde prostřednictvím mateřského mléka; v případech, kdy není dostatek důkazů o kontinuální expozici potomstva, by však mělo být zváženo přímé dávkování potomstvu. Důkazy o kontinuální expozici lze čerpat např. z farmakokinetických informací, toxicity potomstva nebo změn v biologických markerech (28).

POZOROVÁNÍ**Pozorování samic**

22. U všech samic se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav, včetně nemocnosti a úmrtnosti.
23. V období aplikace a pozorování by mělo být periodicky (nejméně dvakrát za období podávání látky za březosti a dvakrát za období podávání látky v době laktace) prováděno podrobnější klinické pozorování nejméně deseti samic na každé úrovni dávky. Zvířata by měla být pozorována mimo chovnou klec kvalifikovanými laboranty, kteří nejsou informováni o tom, do jaké experimentální skupiny zvíře patří, a s použitím standardizovaných postupů, které mají minimalizovat stres u zvířat a neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování v rámci dané studie prováděl pokud možno stejný laborant.
24. Přítomnost zpozorovaných příznaků se zaznamená. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost zpozorovaných příznaků. Klinická pozorování by se měla mimo jiné zaměřit na změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a autonomní funkce (slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace).
25. Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí, třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

26. Zaznamenají se příznaky toxicity, včetně dne jejich nástupu, denní doby, stupně a trvání.
27. Zvířata by se měla v době podávání dávek vážit nejméně jednou týdně po celou dobu studie, v den vrhu nebo jeho blízkosti a v 21. postnatální den (odstavení). Ve studiích podávání látky žaludeční sondou by měly být samice váženy nejméně dvakrát týdně. Při každém stanovení tělesné hmotnosti by měly být upraveny dávky podle potřeby. Během gestačního a laktčního období se spotřeba potravy měří minimálně každý týden. Pokud je expozice prováděna pomocí pitné vody, měří se spotřeba vody nejméně jednou týdně.

Pozorování potomstva

28. Veškeré potomstvo se nejméně jednou denně bedlivě pozoruje, aby se zjistily příznaky toxicity, nemocnost a úmrtnost.
29. Během doby aplikace a pozorování by mělo být prováděno podrobnější klinické pozorování potomstva. Pozorování potomstva (nejméně jedno mládě od každého pohlaví a vrhu) by měli provádět kvalifikovaní laboranti, kteří nejsou informováni o tom, do které experimentální skupiny zvířata patří, a s použitím standardizovaných postupů s cílem minimalizovat neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování prováděl pokud možno stejný laborant. Sledují se přinejmenším sledované vlastnosti popsané v odstavci 24 a 25 podle potřeby vývojového stadia, které je pozorováno.
30. Zaznamenají se veškeré příznaky toxicity u potomstva, včetně dne nástupu, denní doby, stupně a trvání.

Fyzické a vývojové znaky

31. Změny ve vývojových znacích v období před odstavením (např. otevření uší a očí, prořezávání řezáků) úzce souvisí s tělesnou hmotností (30)(31). Tělesná hmotnost může být nejlepším ukazatelem fyzického vývoje. Měření vývojových znaků se proto doporučuje provádět pouze tehdy, jestliže existují dřívější poznatky, že tyto sledované vlastnosti poskytnou doplňující informace. Časový rozvrh pro posuzování těchto parametrů je uveden v tabulce 1. Lze doporučit, aby v závislosti na očekávaných účincích a na výsledcích počátečních měření byly doplněny další časové body nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.
32. Při posuzování fyzického vývoje se doporučuje použít postkoitální věk, a nikoli postnatální věk (33). Jsou-li mláďata testována v den odstavení, doporučuje se, aby byly tyto zkoušky prováděny před skutečným odstavením, aby se vyloučil zkreslující účinek stresu spojeného s odstavením. V období po odstavení by kromě toho neměly být prováděny žádné zkoušky během dvou dnů po odstavení.

Tabulka 1

Časový rozvrh posuzování fyzických a vývojových znaků a sledovaných funkčních/behaviorálních vlastností ^(a)

Sledované vlastnosti	Období věku		
	Před odstavením ^(b)	Dospívání ^(b)	Mladá dospělost ^(b)
Fyzické a vývojové znaky			
Tělesná hmotnost a klinická pozorování	týdně ^(c)	nejméně jednou za dva týdny	nejméně jednou za dva týdny
Hmotnost mozku	22. postnatální den ^(d)		při ukončení studie
Neuropatologie	22. postnatální den ^(d)		při ukončení studie
Pohlavní zralost	—	podle vhodnosti	—
Další vývojové znaky ^(e)	podle vhodnosti	—	—

Sledované vlastnosti	Období věku	Před odstavením ^(b)	Dospívání ^(b)	Mladá dospělost ^(b)
----------------------	-------------	--------------------------------	--------------------------	--------------------------------

Sledované funkční/behaviorální vlastnosti

Behaviorální ontogeneze	nejméně dvě měření			
Motorická aktivita (včetně přivykání)	1–3krát ^(f)	—	jednou	jednou
Motorické a smyslové funkce	—	jednou	jednou	jednou
Učení a paměť	—	jednou	jednou	jednou

^(a) Tato tabulka uvádí minimální počet měření, jež by měla být prováděna. Lze doporučit, aby na základě očekávaných účinků a výsledků počátečních měření byly doplněny další časové body (např. starší zvířata) nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.

^(b) Doporučuje se, aby mláďata nebyla testována v prvních dvou dnech po odstavení (viz odstavec 32). Doporučený věk pro testování dospívajících je: učení a paměť = 25. postnatální den $\pm$ 2; motorické a smyslové funkce = 25. postnatální den $\pm$ 2. Doporučený věk pro testování mladých dospělých je 60.–70. postnatální den.

^(c) Tělesná hmotnost by měla být měřena nejméně dvakrát týdně při přímém dávkování mláďatům za účelem upravení dávek v době rychlého nárůstu tělesné hmotnosti.

^(d) Hmotnost mozku a neuropatologii lze případně posuzovat poněkud dříve (např. 11. postnatální den) (viz odstavec 39).

^(e) Případně by kromě tělesné hmotnosti měly být zaznamenány i jiné vývojové znaky (např. otevření očí) (viz odstavec 31).

^(f) Viz odstavec 35.

33. Živá mláďata se spočítají a rozdělí podle pohlaví, např. vizuální prohlídkou nebo měřením vzdálenosti od konečníku ke genitálu (34)(35) a každé mládě ve vrhu se jednotlivě zváží při narození nebo krátce po něm, nejméně jednou týdně během laktace a poté nejméně jednou za dva týdny. Při hodnocení pohlavní zralosti by mělo být stanoveno stáří a tělesná hmotnost zvířete při vaginálním otevření (36) nebo odpojení předkožky (37) nejméně u jednoho samce a jedné samice z každého vrhu.

Behaviorální ontogeneze

34. Ontogeneze vybraných chování by měla být měřena ve vhodném věku nejméně u jednoho mláděte od každého pohlaví a vrhu, přičemž ve všech zkušebních dnech by se pro všechna posuzovaná chování měla použít stejná mláďata. Dny měření by v tomto období měly být rozvrženy stejnoměrně, aby bylo možno stanovit běžnou změnu v ontogenezi uvedeného chování nebo změnu v souvislosti s aplikací (38). Dále jsou uvedeny některé příklady chování, u kterých by mohla být posuzována ontogeneze: reflex rovnováhy, negativní geotaxe a motorická aktivita (38)(39)(40).

Motorická aktivita

35. Motorická aktivita by měla být sledována (41)(42)(43)(44)(45) v období před odstavením a v dospělosti. Ke zkoušení v době odstavení viz odstavec 32. Zkušební sezení by mělo být dostatečně dlouhé, aby bylo možno prokázat přivykání neexponovaných kontrolních skupin v průběhu sezení. Behaviorální ontogenezi se důrazně doporučuje posuzovat pomocí motorické aktivity. Je-li prováděna zkouška behaviorální ontogeneze, měla by být při všech sezeních v období před odstavením použita stejná zvířata. Zkoušky by měly být prováděny dostatečně často, aby bylo možno posoudit ontogenezi přivykání v průběhu sezení (44). To může vyžadovat tři nebo více časových období před odstavením včetně dne odstavení (např. 13., 17. a 21. postnatální den). Testování stejných zvířat nebo sourozenců z vrhu by mělo být prováděno také v dospělosti nedlouho před ukončením studie (např. 60.–70. postnatální den). Podle potřeby lze provádět zkoušky i v dalších dnech. Motorická aktivita by měla být sledována přístrojem s automatizovaným zaznamenáváním aktivity, který by měl být schopen zjistit zvýšení i poklesy aktivity (tj. výchozí aktivita naměřená tímto zařízením by neměla být tak nízká, aby bránila zjištění zvýšení, ani tak vysoká, aby bránila zjištění poklesu aktivity. Každý přístroj by měl být odzkoušen standardními postupy, aby se zajistila co největší spolehlivost měření všemi přístroji a v různých dnech. Experimentální skupiny by měly být mezi přístroji rozděleny pokud možno vyváženě. Každé zvíře se testuje jednotlivě. Experimentální

skupiny by měly být testovány vyváženě v různé denní dobu s cílem vyloučit zkreslení denními rytmy aktivity. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší a nesouvisely automaticky s aplikací. Mnohá měření chování včetně měření motorické aktivity mohou ovlivnit takové proměnné, jako je úroveň zvuku, velikost a tvar zkušební klece, teplota, relativní vlhkost, světelné podmínky, zápachy, použití chovné klece nebo nové, zkušební klece a odchylky v prostředí.

Motorické a smyslové funkce

36. Motorické a smyslové funkce se podrobně vyšetřují nejméně jednou za období dospívání a jednou v období mladé dospělosti (např. 60.–70. postnatální den). O testování v době odstavení pojednává odstavec 32. Zkoušení by se mělo provádět v dostatečném rozsahu, aby zajistilo dostatečný kvantitativní odběr vzorků smyslových podnětů (např. somatosenzorických, vestibulárních) a motorických aktivit (např. síla, koordinace). Jako několik příkladů zkoušek motorických a smyslových funkcí lze uvést vzpěrnou reakci extenzorů (46), reflex rovnováhy (47)(48), přivýkání úlekové reakci na zvukový podnět (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) a evokované potenciály (55).

Zkoušky učení a paměti

37. Zkouška asociativního učení a paměti se provádí po odstavení (např. 25. postnatální den $\pm$ 2 dny) a u mladých dospělých (60. postnatální den a starší). K testování v době odstavení viz odstavec 32. V obou těchto vývojových stádiích lze použít stejnou nebo odlišnou zkoušku (zkoušky). Při volbě zkoušky (zkoušek) učení a paměti u odstavených mláďat a dospělých potkanů je povolena určitá pružnost. Zkoušky by však měly být koncipovány tak, aby splňovaly dvě kritéria. Zaprvé, učení by mělo být posuzováno buď jako změna mezi několika opakovanými pokusy nebo sezením zabývajícím se učením, nebo při zkouškách sestávajících z jediného pokusu s odkazem na určitou podmínku, která kontroluje neasociativní účinky zkušeností získaných výcvikem. Zadruhé, zkoušky by kromě počátečního učení (nabytí) měly zahrnovat určité měření paměti (krátkodobé nebo dlouhodobé), ale toto měření paměti nelze zaznamenat bez měření osvojených prvků získaných při stejné zkoušce. Jestliže zkouška (zkoušky) učení a paměti zjistí účinek zkoušené chemické látky, lze zvážit další zkoušky za účelem vyloučení jiné interpretace založené na změnách smyslových, motivačních a/nebo motorických schopností. Kromě obou výše uvedených kritérií se doporučuje, aby byla zkouška učení a paměti zvolena na základě prokázané citlivosti na třídu zkoumaných chemických látek, pokud jsou takové informace v literatuře dostupné. Pokud takové informace neexistují, lze pro splnění výše uvedených kritérií provést například tyto zkoušky: pasivní vyhýbání (43)(56)(57), test pracovní paměti (DMP) pro dospělé potkany (58) a mláďata potkanů (59), čichové podmiňování (43)(60), Morrisovo vodní bludiště (61)(62)(63), Bielovo bludiště nebo bludiště Cincinnati (64)(65), radiální bludiště (66), „T“ bludiště (43) a osvojení a uchovávání pravidelných návyků (26)(67)(68). V literatuře jsou popsány další zkoušky pro odstavená mláďata (26)(27) a dospělé potkany (19) (20).

Pitva

38. Matky lze po odstavení potomstva utratit.
39. Neuropatologické hodnocení potomstva se provede vyšetřením tkání zvířat humánně usmrčených v 22. postnatální den nebo v dřívějším časovém bodě mezi 11. a 22. postnatálním dnem, jakož i při ukončení studie. U potomstva usmrčeného do 22. postnatálního dne se hodnotí mozkové tkáně, u zvířat usmrčených při ukončení se hodnotí tkáně centrální nervové soustavy (CNS) a tkáně periferní nervové soustavy (PNS). Zvířata usmrčená v 22. postnatální den nebo dříve lze fixovat ponořením do fixačního roztoku nebo perfuzí. Zvířata usmrčená při ukončení studie by měla být fixována perfuzí. Všechny aspekty přípravy tkáňových vzorků, od perfuze zvířat, přes odebrání tkáňových vzorků, zpracování tkání a barvení preparátů by měly být vyváženě koncipovány tak, aby každá sada obsahovala reprezentativní vzorky z každé exponované skupiny. Další pokyny týkající se neuropatologie lze nalézt v Pokynu OECD č. 20 (9), viz také (103).

Zpracování tkáňových vzorků

40. Všechny závažné abnormality zjevné v průběhu pitvy se zaznamenají. Odebrané tkáňové vzorky by měly reprezentovat všechny hlavní oblasti nervové soustavy. Vzorky tkání by měly být ponechány ve vhodném fixativu a zpracovány podle standardizovaných zveřejněných histologických protokolů (69)(70)(71)(103). U tkání centrální nervové soustavy a periferní nervové soustavy je přípustné zalití do parafinu, avšak je-li požadován větší stupeň rozlišení (např. u periferních nervů, pokud existuje podezření na periferní neuropatii a/nebo při morfometrické analýze periferních nervů), může být vhodná postfixace osmiem spolu se zalitím do pryskyřice. Mozkové tkáně

získané pro morfometrickou analýzu by měly být zality do vhodného média na všech úrovních dávky ve stejnou dobu, aby se zamezilo artefaktům vzniklým smrštěním, ke kterému může dojít v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

Neuropatologické vyšetření

41. Účelem kvalitativního vyšetření je:

- i) zjistit oblasti nervové soustavy vykazující známky neuropatologických změn;
- ii) zjistit typy neuropatologických změn vyplývajících z expozice zkoušené chemické látky; a
- iii) stanovit míru závažnosti těchto neuropatologických změn.

Reprezentativní histologické řezy tkáňových vzorků se mikroskopicky zkoumají za účelem prokázání neuropatologických změn, vyšetření provádí patolog s odpovídající kvalifikací. Všem neuropatologickým změnám se přiřadí subjektivní stupeň vyjadřující jejich závažnost. Pro hodnocení řezů mozku zvířat, jež byla humánně usmrcena v 22. postnatální den nebo dříve, může být dostatečné barvení pomocí hematoxylinu a eosinu. U řezů tkání centrální nervové soustavy a periferní nervové soustavy zvířat usmrčených při ukončení studie se však doporučuje použít barviva na myelin (např. luxolová modř/kresylová violet) a barvení stříbrem (např. podle Bielschowského nebo Bodiana). Na základě odborného úsudku patologa a druhu pozorovaných změn lze zvážit jiná barvení vhodná pro zjištění a charakterizaci konkrétních typů změn (např. gliální fibrilární acidický protein (GFAP) nebo lektinová histochemie pro posouzení gliálních a mikrogliaálních změn (72), fluoro-jade pro zjišťování nekrózy (73)(74) nebo stříbrná barvení používaná při degeneraci nervové soustavy (75)).

42. Mělo by být prováděno morfometrické (kvantitativní) hodnocení, jelikož tyto údaje mohou pomoci při zjišťování účinků souvisejících s expozicí a jsou cenné pro interpretaci rozdílů v hmotnosti mozku nebo v morfologii souvisejících s expozicí. K tomu, aby bylo možno provést morfometrické hodnocení, je třeba odebrat a připravit nervovou tkáň. Morfometrická hodnocení mohou zahrnovat např. lineární nebo plošné měření konkrétních oblastí mozku (78). Lineární nebo plošná měření vyžadují použití homologických řezů pečlivě vybraných na základě spolehlivých mikroskopických znaků (6). Ke zjištění účinků expozice na parametry, jako je objem konkrétních neuroanatomických oblastí nebo počet buněk v těchto oblastech lze použít stereologii (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Vyšetření mozků by se mělo zaměřit na veškeré příznaky neuropatologických změn souvisejících s expozicí a měly by být odebrány dostatečné vzorky ze všech hlavních oblastí mozku (např. čichové laloky, mozková kůra, hippocampus, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek (tektum, tegmentum a pedunculi cerebrales), Varolův most, prodloužená mícha, mozeček), což umožní důkladné vyšetření. Je důležité, aby řezy byly u všech zvířat prováděny ve stejné rovině. Z dospělých zvířat humánně usmrčených při ukončení studie se odeberou reprezentativní řezy páteřní míchy a periferní nervové soustavy. Zkoumané oblasti by měly zahrnovat oko s očním nervem a sítnicí, míchu v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorzální a ventrální kořenová vlákna, n. ischiadicus – proximální část a n. tibialis – proximální část (v oblasti kolena) a n. tibialis z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy.

44. Neuropatologické hodnocení by mělo zahrnovat vyšetření na příznaky vývojových poškození nervové soustavy (6)(85)(86)(87)(88)(89), dále na buněčné změny (např. vakuolizace, degenerace a nekróza neuronů) a tkáňové změny (např. glióza, infiltrace leukocytů, tvorba cyst). V této souvislosti je důležité odlišit účinky související s expozicí od běžných vývojových jevů, ke kterým, jak známo, dochází ve stadiu vývoje odpovídajícím době usmrcení (90). Významnými změnami, jež ukazují na vývojovou poruchu, jsou mimo jiné tyto:

- změny v absolutní velikosti nebo tvaru čichových laloků, mozku nebo mozečku,
- změny v relativní velikosti různých oblastí mozku, včetně zvětšené nebo zmenšené velikosti oblastí vyplývajících ze ztráty nebo přetrvávání normálně přechodných populací buněk nebo z axonálních projekcí (např. vnější zárodečná vrstva mozečku, kalózní těleso),
- změny v proliferaci, migraci a diferenciaci ověřené podle oblastí nadměrné apoptózy nebo nekrózy, klastřů nebo rozptýlených populací ektopických, dezorientovaných nebo malformovaných neuronů, nebo změny v relativní velikosti různých vrstev kortikálních struktur,

- změny v myelinaci, včetně snížení celkové velikosti nebo odlišného zbarvení myelinových struktur,
- příznaky hydrocefalu, zejména zvětšení komor, stenóza cerebrálního akvaduktu a zúžení cerebrálních hemisfér.

Analýza neuropatologických změn z hlediska vztahu dávka-odpověď

45. Pro kvalitativní a kvantitativní neuropatologické analýzy se doporučuje následující postup sestávající z postupných kroků. Zprv, řezů ze skupiny, které byla podávána vysoká dávka, se porovnají s řezů z kontrolní skupiny. Jestliže se u zvířat ze skupiny s vysokou dávkou nenajdou žádné příznaky neuropatologických změn, není žádná další analýza nutná. Jestliže se ve skupině s vysokou dávkou najdou příznaky neuropatologických změn, vyšetří se zvířata ze skupin, kterým byla podávána střední a nízká dávka. Jestliže je skupina s vysokou dávkou ukončena v důsledku úhynu nebo jiné zkreslující toxicity, měly by se analyzovat neuropatologické změny ve skupinách s vysokou a střední dávkou. Existují-li jakékoli příznaky neurotoxicity ve skupinách s nižší dávkou, měla by být provedena neuropatologická analýza těchto skupin. Jestliže se při kvalitativním nebo kvantitativním vyšetření naleznou neuropatologické změny související s expozicí, měla by být stanovena závislost výskytu, četnost a stupeň závažnosti lézí nebo morfometrických změn na velikosti dávky, a to na základě hodnocení všech zvířat ze všech exponovaných skupin. Do tohoto hodnocení by měly být zařazeny všechny oblasti mozku, které vykazují příznaky neuropatologické změny. U každého typu lézí by měly být popsány typické znaky, podle nichž byl stanoven každý stupeň závažnosti, a uvedou se prvky sloužící k odlišení každého stupně od ostatních stupňů. Zaznamená se četnost a stupeň závažnosti každého typu lézí a provede se statistická analýza za účelem zhodnocení vztahu dávka-odpověď. Doporučuje se použít kódované preparáty (91).

ÚDAJE A ZPRÁVY

Údaje

46. Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byly u každé experimentální skupiny uvedeny typy změn a počet samic, potomstvo podle pohlaví a vrhy vykazující každý typ změny. Pokud byla prováděna přímá postnatální expozice potomstva, uvede se způsob, trvání a doba expozice.

Hodnocení a interpretace výsledků

47. Studie vývojové neurotoxicity bude obsahovat informace o účincích opakované expozice určité chemické látky během vývoje *in utero* a raně postnatálního vývoje. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na ukazatele všeobecné toxicity i na ukazatele vývojové neurotoxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi účinky na vývoj nervové soustavy vyskytujícími se za nepřítomnosti všeobecné toxicity u matek a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovni, které jsou toxické i pro březí samice. V důsledku složitých vzájemných souvislostí mezi koncepcí studie, statistickou analýzou a biologickým významem údajů, bude odpovídající interpretace údajů o vývojové neurotoxici zahrnovat odborný posudek (107)(109). Při interpretaci výsledků zkoušek by měl být uplatněn přístup založený na existujících průkazných faktech (20)(92)(93)(94). Uvede se charakteristika behaviorálních nebo morfologických nálezů, pokud jsou přítomny, a poznatky o vztahu dávka-reakce. Tato charakterizace by měla zahrnovat údaje ze všech studií, které mají význam pro hodnocení vývojové neurotoxicity, včetně epidemiologických studií nebo případových studií u lidí a studií na pokusných zvířatech (např. toxikokinetické údaje, informace o vztahu struktura-účinek, údaje z jiných studií toxicity). Patří sem i vztah mezi dávkami zkoušené chemické látky a přítomností či nepřítomností, četností a rozsahem jakýchkoli neurotoxických účinků na každé pohlaví (20)(95).
48. Hodnocení údajů by mělo zahrnovat rozbor výsledků z hlediska jejich biologického i statistického významu. Na statistickou analýzu je nutno pohlížet jako nástroj k řízení, a nikoli nástroj předurčující interpretaci údajů. Nedostatečná statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro učinění závěru o neexistenci účinku souvisejícího s expozicí, stejně tak jako statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro vyvození závěru o existenci účinku souvisejícího s expozicí. Aby se zamezilo případným falešně negativním výsledkům a přirozeným potížím při „prokazování negativního“, měly by být podrobeny rozboru dostupné pozitivní a historické kontrolní údaje, zejména pokud neexistují žádné účinky související s expozicí (102)(106). Pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků by měla být analyzována s ohledem na celkové statistické hodnocení údajů (96). Hodnocení by mělo zahrnovat vztah mezi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálními změnami, pokud takový vztah existuje.

49. Všechny výsledky by měly být analyzovány pomocí statistických modelů vhodných z hlediska koncepce daného experimentu (108). Volba parametrické nebo neparametrické analýzy by měla být zdůvodněna s přihlédnutím k takovým faktorům, jakými jsou povaha údajů (zda jsou transformovány, či nikoli) a jejich distribuce, jakož i relativní spolehlivost zvolené statistické analýzy. Záměr a koncepce studie by měly určovat volbu metod statistické analýzy, aby se minimalizovaly chyby typu I (falešně pozitivní) a typu II (falešně negativní) (96)(97)(104)(105). Vývojové studie, které používají druhy s vícečetnými vrhy, kdy je testováno více mláďat z každého vrhu, by měly mít ve statistickém modelu zahrnut i vrh, aby se zabránilo zvýšenému výskytu chyb I. typu (98)(99)(100)(101). Statistickou jednotkou pro hodnocení výsledků by měl být vrh, a nikoli mládě. Experimenty by měly být koncipovány tak, aby výsledky získané u sourozenců z vrhu nebyly považovány za nezávislá pozorování. Všechny sledované vlastnosti měřené opakovaně u stejného subjektu by měly být analyzovány pomocí statistických modelů, které zohledňují, že tato měření nejsou nezávislá.

Protokol o zkoušce

50. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

- fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikační údaje, včetně zdroje,
- čistota přípravku a známé a/nebo předpokládané nečistoty.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění volby jiného vehikula, pokud není použita voda nebo fyziologický solný roztok.

Pokusná zvířata:

- použitý druh a kmen a zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit potkan,
- dodavatel pokusných zvířat,
- počet, věk na začátku a pohlaví zvířat;
- původ, podmínky chovu, strava, voda atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Podmínky pro provádění zkoušky:

- zdůvodnění volby dávek,
- zdůvodnění způsobu podání a doby podávání dávek,
- specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,
- podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,
- metoda použitá pro jednoznačnou identifikaci samic a potomstva,
- podrobný popis postupu (postupů) náhodného výběru použitých pro přiřazení samic do experimentálních skupin, výběru mláďat pro utracení a zařazení mláďat do exponovaných skupin,
- podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky,
- popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě nebo inhalaci (ppm) na skutečnou denní dávku (mg na 1 kg tělesné hmotnosti),
- podmínky prostředí,
- podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (např. vodovodní, destilovaná),
- datum zahájení a datum ukončení studie.

Pozorování a zkušební postupy:

- podrobný popis postupů použitých pro standardizaci pozorování a postupů, jakož i operativních definic pro pozorování s bodovacím systémem hodnocení účinků,
- seznam všech použitých zkušebních postupů a zdůvodnění jejich použití,
- podrobnosti o použitých behaviorálních/funkčních, patologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,
- postupy pro kalibrování a zajištění rovnocennosti zařízení a vyvážení experimentálních skupin v rámci zkušebních postupů,
- stručné zdůvodnění všech rozhodnutí obsahujících profesionální úsudky.

Výsledky (individuální i souhrnné, případně včetně střední hodnoty a rozptylu:

- počet zvířat na začátku studie a na konci studie,
- počet zvířat a vrhů použitých pro každou zkušební metodu,
- identifikační číslo každého zvířete a vrhu, z kterého pochází,
- velikost vrhu a střední hmotnost při narození podle pohlaví,
- údaje o tělesné hmotnosti a o změnách tělesné hmotnosti, včetně konečné tělesné hmotnosti samic a potomstva,
- údaje o spotřebě potravy a popřípadě o spotřebě vody (např. pokud je zkoušená látka podávána s pitnou vodou),
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity nebo úmrtnosti, popřípadě doba a příčina úmrtí,
- povaha, závažnost, trvání, den nástupu, denní doba a následný průběh podrobných klinických pozorování,
- bodové hodnocení každého vývojového znaku (hmotnost, pohlavní zralost a behaviorální ontogeneze) v každé době pozorování,
- podrobný popis všech behaviorálních, funkčních, neuropatologických, neurochemických, elektrofyziologických nálezů podle pohlaví, včetně nárůstů a poklesů v porovnání s kontrolními skupinami;
- pitevní nálezy,
- hmotnosti mozků,
- jakékoli diagnózy vyvozené z neurologických znaků a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo stavů,
- zobrazení exemplárních nálezů,
- zobrazení s nízkým rozlišením pro posouzení homologie řezů použitých pro morfometrii,
- údaje o absorpci a metabolismu, včetně doplňujících údajů ze samostatné toxikokinetické studie, je-li k dispozici,
- statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých pro analýzu údajů, a výsledky, bez ohledu na to, zda byly významné, či nikoli,
- seznam personálu studie, včetně jeho odborné kvalifikace.

Rozbor výsledků:

- informace o reakci na dávky podle pohlaví a skupin,
- význam veškerých dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky podle pohlaví a skupin,

- dopad toxikokinetických informací na závěry,
- podobnost účinků jakýmkoli známým látkám schopným vyvolat neurotoxicitu,
- údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (tj. pozitivní a historické kontrolní údaje).
- souvislosti, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,
- NOAEL (hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku) nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a skupiny.

Závěry:

- rozbor celkové interpretace údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda zkoušená látka způsobila vývojovou neurotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

LITERATURA

- 1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kodaň, Dánsko, 13.–14. června 1995.
- 2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Dostupné na: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- 3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Dostupné na: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- 4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109, 79–91.
- 5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109, 101–111.
- 6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109, 93–100.
- 7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.
- 8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Dostupné na: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- 9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Dostupné na: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- 10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12, 173–292.
- 11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- 12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 188–197.
- 13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- 14) Kapitola B.34 této přílohy, Jednogeneční zkouška toxicity pro reprodukci.
- 15) Kapitola B.35 této přílohy, Dvougeneční studie reprodukční toxicity.
- 16) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.
- 17) Kapitola B.31 této přílohy, Studie prenatální vývojové toxicity.
- 18) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.
- 19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Dostupné na: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- 20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Dostupné na: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- 21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- 22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19, 499–509.
- 23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38, 2–6.
- 24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27, 110–112.
- 25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13, 118–136.
- 26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- 27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- 28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- 29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24, 87–94.
- 30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1–4.
- 31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčivých přípravků.
- 32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6, 433–439.
- 33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20, 449–457.
- 34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13, 383–390.
- 35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58, 350–365.

- 36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7, 579–586.
- 37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17, 298–303.
- 38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12, 489–495.
- 39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23, 896–920.
- 40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Raven Press, New York, s. 67–100.
- 41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 53–66.
- 42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Raven Press, New York, s. 37–82.
- 43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15, 117–129.
- 44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18, 247–260.
- 45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- 46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19, 1997. 405–411.
- 47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64, 61–669.
- 48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40, 589–591.
- 49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287–351.
- 50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59, 107–128.
- 51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181–211.
- 52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8, 199–211.
- 53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80, 25–30.
- 54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6, 437–445.
- 55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125–145.
- 56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105, 321–332.

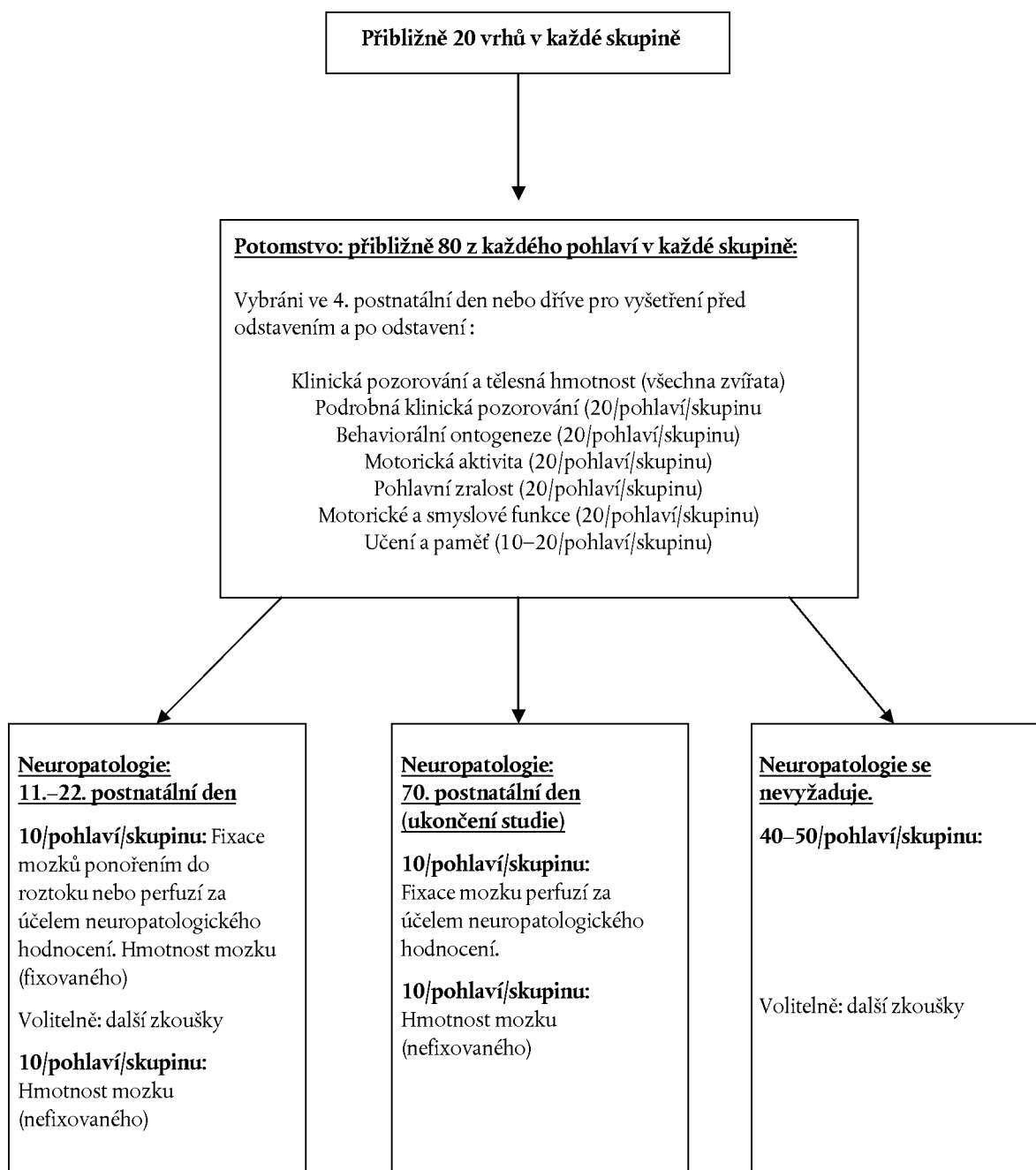
- 57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6, 247–296.
- 58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 237–244.
- 59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103, 98–105.
- 60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17, 465–479.
- 61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11, 47–60.
- 62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48, 29–69.
- 63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36, 60–90.
- 64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9, 235–241.
- 65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20, 387–399.
- 66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 327–332.
- 67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71, 342–352.
- 68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36, 338–341.
- 69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28, 122–131.
- 70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.
- 71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
- 72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24, 291–304.
- 73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874, 123–130.
- 74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53, 365–372.
- 75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545–561.
- 76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19, 745–755.

- 77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S. H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20, 417–432.
- 78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 129–135.
- 79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- 80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 305–310.
- 81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609, 262–268.
- 82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26, 707–710.
- 83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22, 51–61.
- 84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130, 813–831.
- 85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49, 113–121.
- 86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84, 294–298.
- 87) Jensen, K.F., Catalano, S.M. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.
- 88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283, 70–74.
- 89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287, 1056–1060.
- 90) Friede, R.L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- 91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63, 127–133.
- 92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104, 401–405.
- 93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- 94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.
- 95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- 96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5, 113–126.
- 97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8, 21–27.

- 98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6, 329–335.
- 99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12, 165–172.
- 100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14, 221–228.
- 101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7, 587–590.
- 102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26, 345–352.
- 103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. *Toxicol. Pathol.* 34, 296–313.
- 104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3), 205–210.
- 105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41, 295–301.
- 106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 266–287.
- 107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 288–325.
- 108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 326–348.
- 109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 349–381.

Obrázek 1

Obecný zkušební plán funkčních/behaviorálních zkoušek, neuropatologického hodnocení a stanovení hmotností mozku. Tento diagram vychází z popisu uvedeného v odstavci 13–15 (PND = postnatální den). Příklady rozdělení zvířat jsou uvedeny v dodatku 1



Dodatek 1

1. Příklady možného rozdělení jsou popsány a uvedeny v tabulce níže. Tyto příklady mají ukázat, že rozdělení zvířat v rámci studie podle různých zkušebních paradigmat může být provedeno několika různými způsoby.

Příklad č. 1

2. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 22. postnatální den humánně usmrtí 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení. Kromě toho se shromáždí údaje o hmotnosti mozku s použitím nefixovaných mozků ostatních 10 samců a 10 samic z každé úrovně dávky.
3. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro funkčně/behaviorální zkoušky po odstavení (podrobná klinická pozorování, motorická aktivita, úleková reakce na zvukový podnět a zkoušení poznávacích funkcí u dospívajících) a pro posouzení věku pohlavní zralosti. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek a zpracuje se pro neuropatologické hodnocení.
4. Pro zkoušky poznávacích funkcí u mladých dospělých (např. 60.–70. postnatální den) se použije třetí sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) při ukončení studie usmrtí a mozek se vyjme a zváží.
5. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny se ponechá v záloze pro případné další zkoušky.

Tabulka 1

Mláďe č. ^(a)		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Behaviorální ontogeneze Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku, 22. postnatální den Hmotnost mozku, 22. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Podrobná klinická pozorování Motorická aktivita Pohlavní zralost Motorické a smyslové funkce Učení a paměť (25. postnatální den) Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)
3	7	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)
4	8	—	Zvířata v rezervě pro nahrazení nebo další zkoušky

^(a) Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

Příklad č. 2

6. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 11. postnatální den 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) humánně usmrtí. Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení.
7. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro vyšetření po odstavení (podrobná klinická pozorování, motorická aktivita, posouzení věku pohlavní zralosti a motorické a smyslové funkce). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.
8. Pro testování poznávacích funkcí u dospívajících a mladých dospělých se použije 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Pro zkoušky poznávacích funkcí v 23. postnatální den a u mladých dospělých se použijí odlišná zvířata. Při ukončení se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která byla testována jako dospělá, usmrtí, mozek se vyjme a zváží.
9. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která nebyla vybrána pro zkoušky, se při odstavení usmrtí a vyloučí.

Tabulka 2

Mláďč. č. ^(a)		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Behaviorální ontogeneze Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku, 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Podrobná klinická pozorování Motorická aktivita Pohlavní zralost Motorické a smyslové funkce Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)
3	7	10 ♂ + 10 ♀ ^(b)	Učení a paměť (23. postnatální den)
3	7	10 ♂ + 10 ♀ ^(b)	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých
4	8	—	Zvířata usmrčená a vyloučená, 21. postnatální den

^(a) Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

^(b) Pro zkoušky poznávacích funkcí v 23. postnatální den a u mladých dospělých se použijí odlišná mláďata (např. ze sudých/lichých vrhů z celkového počtu 20 vrhů).

Příklad č. 3

10. Pro posouzení hmotnosti mozku a neuropatologie v 11. postnatální den se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 11. postnatální den 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) humánně usmrtí, mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení. Kromě toho se shromáždí údaje o hmotnosti mozku s použitím nefixovaných mozků ostatních 10 samců a 10 samic z každé úrovně dávky.

11. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro testování behaviorální ontogeneze (motorická aktivita), vyšetření po odstavení (motorická aktivita a posouzení věku pohlavní zralosti) a testování poznávacích funkcí u dospívajících.
12. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušky motorických a smyslových funkcí (úleková reakce na zvukový podnět) a pro podrobná klinická pozorování. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.
13. Další sada 20 mláděť od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušení poznávacích funkcí u mladých dospělých. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) usmrtí při ukončení studie, mozek se vyjme a zváží.

Tabulka 3

Mládě č. ^(a)		Počet mláděť zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	10 ♂ + 10 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku v 11. postnatální den Hmotnost mozku v 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze (motorická aktivita) Motorická aktivita Pohlavní zralost Učení a paměť (27. postnatální den)
3	7	20 ♂ + 20 ♀ 20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Úleková reakce (dospívající a mladí dospělí) Podrobná klinická pozorování Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den
4	8	20 ♂ + 20 ♀ 10 ♂ + 10 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých

^(a) Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

*Dodatek 2***Definice**

Chemická látka: látka nebo směs.

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

B.54. UTEROTROFNÍ BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ESTROGENNÍCH VLASTNOSTÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení (TG) 440 (2007). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat metodický návod pro provádění uterotrofní biologické zkoušky u hlodavců. Uterotrofní biologická zkouška u hlodavců poté prošla rozsáhlým validačním programem, který mimo jiné zahrnoval sestavení podrobného podkladového dokumentu (2)(3) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií, aby se prokázal význam a reprodukovatelnost biologické zkoušky s účinným referenčním estrogenem, slabými agonisty estrogenního receptoru, silným antagonistou estrogenního receptoru a negativní referenční chemickou látkou (4) (5)(6)(7)(8)(9). Tato zkušební metoda B.54 vychází ze zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z výsledků těchto zkoušek s agonisty estrogenů.
2. Uterotrofní biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška, která pochází z 30. let 20. století (27)(28) a standardizovanou screeningovou metodou se stala na základě rozhodnutí expertního výboru v roce 1962 (32)(35). Je založena na zvýšení hmotnosti dělohy neboli uterotrofní reakce (přehled viz 29). Hodnotí schopnost chemické látky vyvolávat biologické aktivity odpovídající agonistům nebo antagonistům přírodních estrogenů (např. 17-beta-estradiolu), avšak její použití pro zjištění antagonistních látek je mnohem méně obvyklé než pro zjištění agonistních látek. Děloha reaguje na estrogeny dvojím způsobem: Počáteční reakcí je zvýšení hmotnosti v důsledku nasáknutí vodou. Po této reakci následuje nárůst hmotnosti v důsledku růstu tkáně (30). Reakce dělohy u potkanů a u myší jsou kvalitativně srovnatelné.
3. Tato biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo* a na její provedení je třeba pohlížet v kontextu 'Konceptního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz' (dodatek 2). V tomto konceptním rámci je uterotrofní biologická zkouška zařazena na úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jediném endokrinním mechanismu, tj. estrogenitě.
4. Předpokládá se zařazení uterotrofní biologické zkoušky do baterie zkoušek *in vitro* a *in vivo* za účelem zjištění chemických látek schopných interakce s endokrinním systémem, která nakonec bude sloužit k posouzení rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí. V rámci validačního programu OECD byli používáni silní a slabí agonisté estrogenů s cílem zhodnotit schopnost zkoušky identifikovat estrogenní chemické látky (4)(5)(6)(7)(8). Tímto způsobem byla jasně prokázána citlivost tohoto zkušební postupu z hlediska agonistů estrogenů, jakož i dobrá vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost.
5. Pokud jde o negativní chemické látky, byla do validačního programu zařazena pouze jedna 'negativní' referenční chemická látka, u které byly známy negativní výsledky z uterotrofní zkoušky a dalších zkoušek *in vitro* s využitím receptorů a vazby na receptory. Avšak byly zhodnoceny i další zkušební údaje nesouvisející s validačním programem OECD, jež dále podpořily specifčnost uterotrofní biologické zkoušky pro screening agonistů estrogenů (16).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Agonisté a antagonisté estrogenů působí jako ligandy pro alfa a beta receptory estrogenů a mohou aktivovat nebo potlačovat transkripční aktivitu receptorů. To může potenciálně vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty estrogenů. Afinity ligandu k estrogenovému receptoru nebo aktivace transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, je pouze jedním z několika určujících faktorů možného nebezpečí. Jiné určující faktory mohou zahrnovat aktivaci a deaktivaci metabolismu po vstupu do organismu, distribuci do cílových tkání a odstranění z těla, což přinejmenším zčásti závisí na způsobu podávání a na zkoušené chemické látce. Z toho vyplývá potřeba zjištění možné aktivity chemické látky *in vivo* za určitých podmínek, pokud dostatečné informace neposkytují již vlastnosti ADME (absorpce – distribuce – metabolismus – eliminace) dané chemické látky. Děložní tkáň reagují na stimulaci estrogeny rychlým a mohutným růstem, zejména u laboratorních hlodavců, kde estrální cyklus trvá přibližně čtyři dny. Druhy hlodavců, zejména potkan, se rovněž široce používají ve studiích toxicity za účelem charakterizace nebezpečí. Děloha hlodavců je proto vhodným cílovým orgánem pro zjišťování estrogenních agonistů a antagonistů *in vivo*.
7. Tato zkušební metoda je založena na postupech použitých při validační studii OECD, u kterých byla při vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studiích prokázána jejich spolehlivost a opakovatelnost. V současné době jsou k dispozici dvě metody, a sice metoda používající dospělé samice s odstraněnými vaječníky a metoda s použitím

nezralých mláďat bez odstranění vaječníků. V rámci programu validačních zkoušek OECD bylo prokázáno, že obě metody mají srovnatelnou citlivost a reprodukovatelnost. Nezralé mládě, protože má intaktní hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osu, je ovšem poněkud méně specifické, avšak umožňuje širší rozsah vyšetření než zvíře s odstraněnými vaječníky, jelikož může reagovat na chemické látky, které interagují s HPG osou, a nikoli pouze s estrogenním receptorem. HPG osa potkana je funkční přibližně ve věku 15 dnů. Předtím nelze pubertu urychlit, např. podáváním hormonu uvolňujícího gonadotropiny. Jak samice začínají dosahovat puberty, budou mít před otevřením vagíny několik tichých cyklů, které nevedou k vaginálnímu otevření nebo k ovulaci, ale v organismu probíhají určité hormonální výkyvy. Jestliže určitá chemická látka přímo či nepřímo stimuluje HPG osu, vede to k předčasné pubertě, časně ovulaci a urychlenému vaginálnímu otevření. Takové účinky mohou být vyvolány nejen chemickými látkami prostřednictvím působení na HPG osu, ale podobný účinek může mít i určitý typ potravy. Některé diety s vyšší úrovní metabolizovatelné energie mohou stimulovat růst a urychlovat vaginální otevření, aniž by byly přímo estrogenní. U dospělých zvířat s odstraněnými vaječníky by takové chemické látky nevyvolávaly uterotrofní reakci, jelikož jejich HPG osa nefunguje.

8. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty by měla být upřednostňována metoda používající nezralé potkany, kdy nedochází k chirurgické předúpravě zvířat a nedochází také k případnému nepoužití těch zvířat, která vykazují příznaky estru (říje) (viz odstavec 30).
9. Uterotrofní reakce není čistě estrogenního původu, tj. reakci mohou vyvolat i jiné chemické látky než agonisté nebo antagonisté estrogenů. Například ke stimulační reakci mohou vést poměrně vysoké dávky progesteronu, testosteronu nebo různých syntetických progestinů (30). Jakoukoli reakci lze analyzovat histologicky z hlediska keratinizace a kornifikace vagíny (30). Bez ohledu na možný původ reakce by pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky měl běžně vyvolat kroky zaměřené na další vyjasnění. Další poznatky o estrogenitě by mohly přinést studie *in vitro*, jako jsou studie vazby na estrogenní receptory a studie transkripční aktivity, nebo jiné *in vivo* studie, jako např. studie puberty u samic.
10. Vzhledem k tomu, že uterotrofní biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo*, byla při validaci zaměřena pozornost hlavně na dobré zacházení se zvířaty a stupňovitou strategii zkoušení. Proto bylo úsilí zaměřeno na přísné ověření reprodukovatelnosti a citlivosti zkoušky na estrogenitu – což je hlavním zájmem u mnoha chemických látek – a složce antiestrogenity této zkoušky byla věnována malá pozornost. Zkoušen byl pouze jeden antiestrogen se silným působením, jelikož počet chemických látek s jasným antiestrogenním profilem (nezastíněným určitým estrogenním působením) je velmi omezený. Tato zkušební metoda je tudíž určena pro estrogenní protokol a protokol popisující antagonistní stránku zkoušky je obsažen v Pokynech (37). Reprodukovatelnost a citlivost zkoušky v případě chemických látek s čistě antiestrogenním působením bude přesněji stanovena později, až bude tento zkušební postup po nějakou dobu běžně používán a bude identifikováno více chemických látek s tímto druhem působení.
11. Má se za to, že veškeré postupy založené na zvířatech budou splňovat normy jednotlivých zemí v oblasti péče o zvířata. Popis péče a zacházení, který je stanoven níže, představuje minimální požadavky a bude nahrazen místními předpisy, např. směrnici Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (25).
12. Stejně jako u všech zkoušek používajících živá zvířata je nezbytné před zahájením zkoušek zajistit, že údaje jsou skutečně nezbytné. Dvě podmínky, kdy mohou být údaje nutné, jsou například tyto:
 - vysoký expoziční potenciál (úroveň 1 koncepčního rámce, dodatek 2) nebo příznaky estrogenity (úroveň 2), aby se zjistilo, zda takový účinek může nastat *in vivo*,
 - účinky naznačující estrogenitu na úrovni 4 nebo 5 zkoušení *in vivo*, aby se potvrdilo, že tyto účinky souvisely s estrogenním mechanismem, který nelze objasnit použitím zkoušky *in vitro*.
13. Definice použité při této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Uterotrofní biologická zkouška je z hlediska své citlivosti založena na systému testování zvířat, při kterém hypothalamo-hypofýzo-ovariální osa není funkční, což vede k nízkým endogenním úrovním cirkulujícího estrogenu. To zajistí nízkou výchozí hmotnost dělohy a maximální šíři reakce na podávané estrogeny. Tento požadavek splňují dva stavy samic hlodavců, kdy jsou citlivé na estrogeny:
- i) nezralé samice po odstavení a před pubertou; a
 - ii) mladé dospělé samice po odstranění vaječníků s dostatečnou dobou na to, aby se děložní tkáň mohly vrátit do původního stavu.
15. Zkoušená chemická látka je podávána denně žaludeční sondou nebo subkutánní injekcí. Odstupňované dávky zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálním skupinám (pro pokyny viz odstavec 33) pokusných zvířat s použitím jedné úrovně dávky na každou skupinu a dobou aplikace tři po sobě jdoucí dny v případě použití metody nezralých mláďat a nejméně tři po sobě jdoucí dny v případě metody dospělého zvířete s odstraněnými vaječníky. Přibližně 24 hodin po poslední dávce se zvířata podrobí pitvě. U agonistů estrogenu se posoudí střední hmotnost dělohy experimentálních skupin zvířat v porovnání se skupinou s vehikulem s cílem zjistit, zda došlo ke statisticky významnému zvýšení. Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy experimentální skupiny ukazuje na pozitivní reakci v této biologické zkoušce.

POPIS METODY

Výběr druhu zvířat

16. Lze použít běžně užívané kmeny laboratorních hlodavců. Při validaci byly například použity kmeny potkanů Sprague-Dawley a Wistar. Neměly by se používat kmeny, o kterých se ví nebo předpokládá, že mají méně reaktivní dělohu. Laboratoř by měla prokázat citlivost použitého kmene, jak je popsáno v odstavcích 26 a 27.
17. Od 30. let 20. století jsou k uterotrofní biologické zkoušce běžně používáni potkani a myši. Validační studie OECD byly prováděny pouze na potkanech na základě toho, že existuje obecná shoda, jež předpokládá, že oba druhy jsou rovnocenné, a proto by v zájmu úspory zdrojů a zvířat měl pro celosvětové ověření postačovat jeden druh. Ve většině studií reprodukční a vývojové toxicity je zvoleným druhem potkan. Vzhledem k tomu, že u myši existuje rozsáhlá historická databáze a aby působnost zkušební metody pro provádění uterotrofní biologické zkoušky na hlodavcích byla rozšířena i na použití myši jako zkušebního druhu, byla provedena zkrácená následná validační studie na myších (16). V souladu s původním záměrem úspory zdrojů a zvířat byl vybrán překlenovací přístup s omezeným počtem zkoušených chemických látek, zúčastněných laboratoří a bez testování kódovaných vzorků. Tato překlenovací validační studie ukazuje, že v případě uterotrofní biologické zkoušky na mladých dospělých myších s odstraněnými vaječníky jsou údaje získané u potkanů a myši kvalitativně i kvantitativně v souladu. To umožňuje v případech, kdy výsledek uterotrofní biologické zkoušky může předcházet dlouhodobé studii, použít v obou studiích zvířata stejného kmene a původu. Překlenovací přístup byl omezen na myši s odstraněnými vaječníky a zpráva neposkytuje soubor údajů pro ověření modelu s nezralými mláďaty, a tudíž model s nezralými mláďaty u myši se do stávající zkušební metody nezahrnuje.
18. V některých případech tedy mohou být místo potkanů použity myši. Výběr tohoto druhu je třeba zdůvodnit na základě toxikologických, farmakokinetických a/nebo jiných kritérií. U myši mohou být nezbytné změny v testovacím postupu. Například potřeba potravy na základě tělesné hmotnosti je u myši vyšší než u potkanů, a obsah fytoestrogenu v potravě by proto měl být u myši nižší než u potkanů (9)(20)(22).

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat místním normám péče o laboratorní zvířata. Zde uvedené popisy péče a zacházení představují minimální požadavky a budou nahrazeny místními právními předpisy, např. směrnici Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem by měla být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy.
20. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata *ad libitum*. Mladá dospělá zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po skupinách, maximálně tříčlenných. Vzhledem k nízkému věku nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách.

21. Je známo, že vysoká úroveň fytoestrogenů v laboratorní stravě zvyšuje hmotnost dělohy u hlodavců v míře, která může narušit uterotrofní biologickou zkoušku (13)(14)(15). Vysoká úroveň fytoestrogenů a metabolizovatelné energie v laboratorní stravě může mít rovněž za následek časný nástup puberty, jestliže se používají nezralá zvířata. Přítomnost fytoestrogenů vyplývá především ze zařazení produktů ze sóji a vojtek do laboratorní stravy a ukázalo se, že koncentrace fytoestrogenů v jednotlivých šaržích standardní laboratorní stravy je různá (23). Důležitou proměnnou je tělesná hmotnost, neboť množství spotřebované potravy souvisí s tělesnou hmotností. Skutečná dávka spotřebovaných fytoestrogenů ze stejné stravy se proto může lišit podle druhu a podle věku (9). U nezralých samic potkana může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně dvojnásobně vyšší než u mladých dospělých samic s odstraněnými vaječníky. U mladých dospělých myši může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně čtyřnásobně vyšší než u mladých dospělých samic potkana s odstraněnými vaječníky.
22. Výsledky uterotrofní biologické zkoušky (9)(17)(18)(19) však ukazují, že omezené množství fytoestrogenů ve stravě je přijatelné a nesnižuje citlivost biologické zkoušky. Určitým vodítkem může být, že u nezralých samic potkana Sprague-Dawley a Wistar by úroveň fytoestrogenů ve stravě neměla přesáhnout 350 µg ekvivalentů genisteinu na gram laboratorní stravy (6)(9). Taková strava by měla být vhodná i při zkouškách na mladých dospělých potkanech s odstraněnými vaječníky, protože spotřeba potravy měřená na jednotku tělesné hmotnosti je u mladých dospělých nižší než u nezralých zvířat. Mají-li být použity dospělé myši s odstraněnými vaječníky nebo potkani citlivější na fytoestrogeny, musí být zváženo úměrné snížení úrovně fytoestrogenů v stravě (20). Rozdíly v dostupné metabolizovatelné energii z různé stravy navíc mohou vést k časovým posunům v nástupu puberty (21)(22).
23. Před studií je nutný pečlivý výběr stravy bez zvýšené úrovně fytoestrogenů (jako vodítko viz (6)(9)) nebo zvýšené úrovně metabolizovatelné energie, jež mohou zkreslit výsledky (15)(17)(19)(22)(36). Pro zajištění náležité výkonnosti zkušebního systému, který laboratorista použije, jak stanoví odstavec 26 a 27, je důležité zkontrolovat oba tyto faktory. Pro jistotu by v souladu se zásadami správné laboratorní praxe (SLP) měly být z každé sady stravy podávané během studie odebrány reprezentativní vzorky pro případnou analýzu obsahu fytoestrogenů (např. v případě vysoké kontrolní hmotnosti dělohy ve srovnání s historickými kontrolami nebo nepřiměřené reakce na referenční estrogen, 17-alfa-ethinylestradiol). Vzorky by měly být analyzovány během studie nebo zmrazené na -20 °C nebo ošetřené takovým způsobem, aby se zabránilo změně složení před analýzou.
24. Některá steliva mohou obsahovat přirozeně se vyskytující estrogenní nebo antiestrogenní chemické látky (např. je známo, že kukuřičný klas ovlivňuje cykličnost u potkanů a podle všeho je antiestrogenní). Zvolené stelivo by mělo obsahovat minimální úroveň fytoestrogenů.

Příprava zvířat

25. Pokusná zvířata bez příznaků jakékoli choroby nebo fyzických abnormalit se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nezralá zvířata by během aklimatizace měla být pokud možno umístěna do klecí s matkami nebo adoptivními matkami až do odstavení. Doba aklimatizace před zahájením studie by u mladých dospělých zvířat a u nezralých zvířat dodaných spolu s matkami nebo adoptivními matkami měla trvat přibližně 5 dnů. Pokud jsou nezralá zvířata získána jako odstavená mláďata bez matek, může se stát, že dobu aklimatizace bude nutné zkrátit, jelikož podávání dávek by mělo začít bezprostředně po odstavení (viz odstavec 29).

POSTUP

Ověření odborné způsobilosti laboratoře

26. Odbornou způsobilost laboratoře lze ověřit dvěma různými způsoby:
- pravidelné ověřování založené na počáteční výchozí studii s pozitivní kontrolní látkou (viz odstavec 27). Nejméně každých 6 měsíců – a pokaždé, když dojde ke změně, která může ovlivnit provedení studie (např. nové složení stravy, změna personálu provádějícího sekce, změna kmene nebo dodavatele zvířat apod.) – by měla být ověřena reakční schopnost zkušebního systému (modelu zvířat) pomocí vhodné dávky (na základě výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou popsané v odstavci 27) referenčního estrogenu: 17-alfa-ethinylestradiolu (číslo CAS 57-63-6)(EE).
 - použití souběžných kontrol tak, že se do každé zkoušky zařadí skupina, které je podávána vhodná dávka referenčního estrogenu.

Jestliže systém nereaguje podle očekávání, měly by se zkušební podmínky přezkoumat a odpovídajícím způsobem upravit. Doporučuje se, aby dávka referenčního estrogenu, která má být použita při každém postupu, byla přibližně 70 až 80 ED.

27. **Výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou.** Dříve, než laboratoř provede poprvé studii podle této zkušební metody, měla by být prokázána odborná způsobilost laboratoře zkouškou reakční schopnosti daného modelu zvířat, při které se vyvolá reakce na dávku referenčního estrogenu: 17-alfa-ethinyloestradiolu (číslo CAS 57-63-6) (EE) s aplikací nejméně čtyř dávek. Odpověď hmotnosti dělohy bude porovnána se zjištěnými historickými údaji (viz odkaz (5)). Pokud tato výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou nedá předpokládané výsledky, měly by se přezkoumat a upravit zkušební podmínky.

Počet a stav zvířat

28. Každá pokusná a kontrolní skupina by měla zahrnovat nejméně 6 zvířat (pro oba protokoly metody nezralých mláďat a metody dospělých s odstraněnými vaječníky).

Věk nezralých zvířat

29. U uterotrofní biologické zkoušky s nezralými zvířaty musí být uveden den narození. Podávání dávek by mělo začít dostatečně brzy, aby se zajistilo, že na konci podávání zkoušené chemické látky ještě nedojde k fyziologickému růstu endogenních estrogenů spojenému s pubertou. Na druhé straně existují poznatky, že velmi mladá zvířata mohou být méně citlivá. Pro stanovení optimálního věku by každá laboratoř měla vzít v úvahu své vlastní podkladové údaje o dozrávání.

Jako všeobecné vodítko lze uvést, že u potkanů lze začít s podáváním dávek ihned po časném odstavení v 18. postnatální den (přičemž den narození je postnatálním dnem 0). Podávání dávek u potkanů by mělo být ukončeno v 21. postnatální den, ale v každém případě před 25. postnatálním dnem, protože po dosažení tohoto věku se hypothalamo-hypofýzo-ovariální osa stává funkční a úroveň endogenního estrogenu může začít růst, což je doprovázeno růstem průměrné základní hmotnosti dělohy a nárůstem směrodatných odchylek ve skupinách (2)(3)(10)(11)(12).

Postup odstranění vaječníků

30. U samic potkana a myši (experimentální skupina a kontrolní skupina), kterým mají být odstraněny vaječníky, by k odstranění vaječníků mělo dojít mezi 6. a 8. týdnem věku. U potkanů by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 14 dnů, aby se umožnil návrat dělohy do minimálního, stabilního výchozího stavu. U myši by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 7 dnů. Jelikož pro vyvolání významné cirkulující úrovně estrogenů (3) postačí malé množství tkáně vaječníků, zvířata by před použitím měla být nejméně po pět po sobě jdoucích dnů (např. u potkanů v 10.–14. den po odstranění vaječníků) zkoušena pozorováním epitelálních buněk získaných výtěrem z vagíny. Pokud zvířata vykazují jakékoli příznaky, že vstupují do estru, neměla by být použita. Dále by při pitvě měly být zkoumány zbytky vaječníků, zda neexistují příznaky přítomnosti vaječnickové tkáně. Pokud ano, dané zvíře by nemělo být použito pro výpočty (3).
31. Při zahájení postupu odstranění vaječníků je zvíře ve ventrální poloze poté, co bylo řádně anestezováno. Řez otevírající dorzo-laterální stěnu břišní by měl být přibližně 1 cm dlouhý, od středu mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní a několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Vaječník se vyjme z břišní dutiny a položí na aseptickou podložku. Vaječník se oddělí ve spojení vejcovodu s tělem dělohy. Po ujištění, že nedochází k masivnímu krvácení, by břišní stěna měla být uzavřena suturou a kůže klipsy nebo vhodným stehem. Místa podvazu jsou schematicky ukázány na obrázku 1. Mělo by být použito vhodné pooperační tišení bolesti v souladu s doporučením veterinárního lékaře se zkušenostmi v oblasti péče o hlodavce.

Tělesná hmotnost

32. Při metodě dospělých samic s odstraněnými vaječníky tělesná hmotnost a hmotnost dělohy spolu nekorelují, protože hmotnost dělohy je ovlivňována hormony, např. estrogeny, ale nikoli růstovými faktory, které regulují velikost těla. Naopak v modelu s nezralými zvířaty tělesná hmotnost s hmotností dělohy souvisí, dokud dospívají (34). V okamžiku zahájení studie by tak v modelu nezralých zvířat měla být odchylka v jejich hmotnosti

minimální a neměla by překročit $\pm 20\%$ střední hodnoty hmotnosti. To znamená, že velikost vrhu by měla být chovatelem standardizována, aby se zajistilo, že potomstvo různých mateřských zvířat bude krmeno přibližně stejně. Zvířata by měla být přiřazena ke skupinám (kontrolním a experimentálním) náhodným rozdělením z hlediska hmotnosti, takže střední tělesná hmotnost každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k přiřazení sourozenců z vrhu do stejné experimentální skupiny, pokud možno bez zvyšování počtu vrhů, jež mají být používány při vyšetřeních.

Dávkování

33. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít estrogenní účinek *in vivo*, běžně postačí dvě exponované skupiny a jedna kontrolní skupina, a s ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je proto upřednostňováno toto uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-odpověď nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně tři exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjištění estrogenního působení (např. odhad potence), měl by být zvolen odlišný režim dávkování. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině ve stejném objemu, který byl použit v experimentálních skupinách (nebo v nejvyšším objemu použitým v exponovaných skupinách, pokud je u jednotlivých skupin rozdílný).
34. V případě uterotrofní biologické zkoušky je cílem vybrat dávky, které zaručují přežití zvířat a nezpůsobují významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí tří po sobě jdoucích dnů podávání chemické látky, až do maximální dávky 1 000 mg/kg/den. Při výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla především zohlednit hodnotu LD₅₀ a/nebo informace o akutní toxicitě, aby nedošlo k úmrtí, vážnému poškození nebo utrpení zvířat (24)(25)(26). Nejvyšší dávka by měla představovat maximální tolerovanou dávku; přijata by byla i studie provedená s úrovní dávky, jež vyvolala pozitivní uterotrofní reakci. V rámci screeningu jsou obecně přijatelné velké intervaly v dávkování (např. jedna polovina logaritmických jednotek, což odpovídá zvyšování dávky po 3,2, nebo dokonce až do 1 logaritmické jednotky). Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek, aby se podle ní určily dávky, které mají být použity.
35. Alternativně, pokud může být estrogenní potence agonistní látky odhadnuta podle údajů získaných *in vitro* (nebo *in silico*), mohou být pro výběr dávky vzaty v úvahu tyto údaje. Například množství zkoušené chemické látky, které by vyvolalo uterotrofní reakce ekvivalentní referenční agonistní látce (ethinylestradiolu), se odhaduje podle jejich relativních *in vitro* potencií vůči ethinylestradiolu. Nejvyšší zkušební dávka by byla získána vynásobením této ekvivalentní dávky vhodným koeficientem, např. 10 nebo 100.

Experimentální zjištění rozmezí dávek

36. V případě nutnosti může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek na několika zvířatech. V této souvislosti lze použít Pokyn OECD č. 19 (25), který stanoví klinické příznaky ukazující na toxicitu nebo utrpení zvířat. Je-li to v rámci této předběžné studie možné, pak po třech dnech podávání lze přibližně po 24 hodinách od poslední dávky vyjmout dělohy a zvážit je. Tyto údaje by poté mohly být použity jako pomocné údaje pro naplánování hlavní studie (vybrat přijatelnou nejvyšší a nejnižší dávku a doporučit počet exponovaných skupin).

Podávání látky

37. Zkoušená chemická látka je podávána ústní sondou nebo subkutánní injekcí. Při volbě způsobu podávání musí být zohledněny zásady dobrého zacházení se zvířaty, jakož i toxikologické aspekty, jako je vhodnost zvoleného způsobu podávání z hlediska expozice člověka dané chemické látce (např. ústní sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, a zvláště pak existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při konkrétním způsobu podávání).
38. Kdykoliv to bude možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však většina estrogenních ligandů nebo jejich metabolických prekursorů má tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Tyto oleje však mají různou kalorickou hodnotu a obsah tuku, a vehikulum by tak mohlo ovlivnit celkový příjem metabolizovatelné energie, což by mohlo změnit měřené sledované vlastnosti, např. hmotnost dělohy, zvláště při použití metody s nezralými zvířaty (33). Každé vehikulum, které má být použito, by mělo být před studií testováno oproti

kontrolní skupině bez vehikula. Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit na konečnou pracovní koncentraci ve zkušebním vehikulu. Musí být známa toxická charakteristika daného rozpouštědla a měla by být prověřena na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stabilní, lze rozpuštění zkoušené chemické látky napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být určena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden zásobní roztok zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování.

39. Nastavení dávkování bude záviset na použitém modelu (viz odstavec 29 o modelu nezralých zvířat a odstavec 30 o modelu dospělých zvířat s odstraněnými vaječníky). Nezralým samicím potkana se denně podává zkoušená chemická látka po dobu tří po sobě jdoucích dnů. Třídenní expozice se doporučuje také u samic potkana s odstraněnými vaječníky, ale delší expozice jsou přijatelné a mohou zlepšit detekci slabě působících chemických látek. U samic myši s odstraněnými vaječníky by aplikace po dobu 3 dnů měla být dostatečná s tím, že prodloužení až na sedm dnů by v případě silných agonistů estrogenů nepřineslo významnou výhodu. Avšak u slabých estrogenů podle výsledků validační studie (16) toto neplatí a dávkování u dospělých myši s odstraněnými vaječníky by mělo být prodlouženo až na 7 po sobě jdoucích dnů. Dávky je třeba podávat každý den přibližně ve stejnou dobu. Měly by být přizpůsobeny tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (např. miligram zkoušené chemické látky na kilogram tělesné hmotnosti za den). Pokud jde o zkušební objem, jeho variabilita by na základě tělesné hmotnosti měla být minimalizována nastavením koncentrací podávaného roztoku tak, aby byl zajištěn konstantní objem ve vztahu k tělesné hmotnosti při všech úrovních dávky a při jakémkoli způsobu podávání.
40. Pokud se zkoušená chemická látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné denní dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny týkající se péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.
41. Pokud se zkoušená chemická látka podává subkutánní injekcí, podává se v jedné denní dávce. Dávky by měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenávají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, rozdělený do dvou míst vpichu, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Pozorování

Obecná a klinická pozorování

42. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Mělo by se provádět každý den nejlépe ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Proveďte se prohlídka všech zvířat za účelem zjištění mortality, morbidity a obecných klinických příznaků, jako jsou změny chování, změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

43. Všechna zvířata by se měla denně zvážet s přesností na 0,1 g, první vážení by mělo být provedeno těsně před zahájením aplikace, tj. když jsou zvířata rozdělena do skupin. Alternativně lze měřit množství potravy spotřebované během doby aplikace na každou klec zvážením krmítek. Výsledky spotřeby potravy by měly být vyjádřeny v gramech na jednoho potkana za den.

Sekce a měření hmotnosti dělohy

44. Po 24 hodinách od poslední aplikace se potkani humánně usmrtí. Ideálně bude pořadí pitev určeno náhodným výběrem mezi skupinami, aby nedošlo k přímému postupu od nejméně exponované skupiny k nejvíce exponované skupině, či naopak, což by mohlo poněkud ovlivnit údaje. Cílem biologické zkoušky je změřit hmotnost dělohy ve vlhkém a vysušeném stavu. Hmotnost ve vlhkém stavu zahrnuje dělohu a obsah lumenální tekutiny. Hmotnost ve vysušeném stavu se měří po vytlačení a odstranění lumenálního obsahu.

45. Před sekci bude vyšetřena vagina, jaký je stav jejího otevření u nezralých zvířat. Postup sekce začíná otevřením břišní stěny počínaje od srůstu stydké kosti. Poté se od dorzální břišní stěny oddělí roh dělohy a vaječníky. Od ventrální a laterální strany dělohy a vaginy se oddělí močový měchýř a močovody. Odděluje se fibrózní adheze mezi rektum a vaginou dokud nelze identifikovat spojení poševního vchodu s perineální kůží. Děloha a vagina se oddělí od těla naříznutím poševní stěny těsně nad spojením mezi perineální kůží, jak je ukázáno na obrázku 2. Děloha by měla být oddělena od bočního svalstva jemným odříznutím děložního okruží v bodě jeho připojení po celé délce dorzálně laterálního aspektu každého děložního rohu. Po oddělení od těla by s dělohou mělo být zacházeno dostatečně rychle, aby se zamezilo vysychání tekutin. U malých tkání, jako je děloha, ztráta hmotnosti v důsledku vysychání nabývá na významu (23). Jsou-li přítomny vaječníky, oddělí se ve vejcovodu, čímž se zamezí ztráty luminální tekutiny z děložního rohu. Pokud byly u zvířete vaječníky odstraněny, měly by být pahýly vyšetřeny, zda nejsou přítomny tkáně vaječnicků. Přebytný tuk a spojovací tkáň by měly být odstraněny. Vagina se oddělí od dělohy těsně pod děložním hrdlem, takže hrdlo zůstane s tělem dělohy, jak je ukázáno na obrázku 2.
46. Každá děloha by měla být přenesena do jednoznačně označené a zvážené nádoby (např. Petriho misky nebo plastové misky vah), přičemž je nadále třeba dbát na to, aby nedošlo k vysychání před zvážením (např. do nádoby lze umístit filtrační papír slabě navlhčený fyziologickým roztokem). Děloha s luminální tekutinou se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vlhkém stavu).
47. Každá děloha pak bude jednotlivě zpracována za účelem odstranění luminální tekutiny. Oba děložní rohy budou propíchnuty nebo podélně rozříznuty. Děloha se položí na slabě zvlhčený filtrační papír (např. Whatman č. 3) a jemně se stlačí druhým kusem slabě navlhčeného filtračního papíru tak, aby luminální tekutina byla zcela odstraněna. Děloha bez luminálního obsahu se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vysušeném stavu).
48. Hmotnost dělohy při ukončení studie lze použít pro potvrzení toho, že nebyl překročen vhodný věk u nezralého intaktního potkana, avšak rozhodující v tomto směru jsou historické údaje o kmeni potkanů použitým laboratoří (viz odstavec 56 pro interpretaci výsledků).

Volitelná vyšetření

49. Po zvážení může být děloha fixována do 10 % neutrálního pufovaného formalínu, aby po zbarvení hemotoxylinem a eosinem (HE) mohla být podrobena histopatologickému vyšetření. Vaginu lze vyšetřit odpovídajícím způsobem (viz odstavec 9). Dále může být provedeno morfometrické měření endometriálního epitelu za účelem kvantitativního srovnání.

ÚDAJE A ZPRÁVY

Údaje

50. Údaje o studii by měly zahrnovat:
- počet zvířat na začátku studie,
 - počet a identifikaci zvířat nalezených uhynulých nebo zvířat utracených během zkoušky z humánních důvodů a datum a čas každého úmrtí nebo humánního usmrcení,
 - počet a identifikaci zvířat vykazujících příznaky toxicity a popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, doby trvání a závažnosti toxických účinků, a
 - počet a identifikaci zvířat vykazujících léze a popis typu lézí.
51. U jednotlivých zvířat by měly být zaznamenány údaje o tělesné hmotnosti, hmotnosti dělohy ve vlhkém stavu a hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu. Jednotné statistické analýzy agonistních látek by měly být použity ke stanovení toho, zda podávání zkoušené chemické látky vedlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení hmotnosti dělohy. Měly by být provedeny vhodné statistické analýzy za účelem zjištění, zda v souvislosti s aplikací došlo ke změnám hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu. Údaje lze například hodnotit pomocí metody analýzy kovariance (ANCOVA), kdy kovariátou (doprovodnou proměnnou) bude tělesná hmotnost při pitvě. Před analýzou údajů lze provést logaritmickou transformaci údajů o děloze stabilizující rozptyl. Pro provedení párových srovnání každé exponované skupiny s kontrolními skupinami, kterým bylo podáváno vehikulum, a pro výpočet intervalů spolehlivosti je vhodné použít Dunnettova a Hsuova testu. Pro zjištění případných

odlehklých hodnot a posouzení homogenity rozptylů lze použít metodu *Studentised residual plots*. Tyto postupy byly použity ve validačním programu OECD za použití postupu PROC GLM v systému statistické analýzy (SAS Institute, Cary, NC), verze 8 (6)(7).

52. Závěrečná zpráva musí obsahovat:

Zkušební zařízení:

- odpovědní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,
- údaje z výchozí zkoušky s pozitivní kontrolní látkou a údaje z pravidelných pozitivních kontrol (viz odstavce 26 a 27).

Zkoušená chemická látka:

- charakterizace zkoušených chemických látek,
- fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- metoda a frekvence přípravy roztoků,
- veškeré získané údaje o stabilitě,
- veškeré analýzy roztoků použitých k aplikaci

Vehikulum:

- charakterizace vehikula použitého při zkoušce (povaha, dodavatel a šarže),
- zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

- druh a kmen a zdůvodnění jejich výběru,
- dodavatel a konkrétní dodavatelské zařízení,
- věk při dodání s datem narození,
- v případě nezralých zvířat, zda byla dodána s matkou nebo adoptivní matkou, či nikoli, a datum odstavení,
- podrobnosti o postupu aklimatizace zvířat,
- počet zvířat v každé kleci,
- podrobnosti a metoda identifikace jednotlivých zvířat a skupin.

Podmínky zkoušky:

- podrobnosti o procesu náhodného výběru (tj. použitá metoda),
- zdůvodnění výběru dávek,
- podrobnosti o složení zkoušené chemické látky, její dosažené koncentrace, stabilita a homogenita,
- podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,
- strava (název, typ, dodavatel, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),
- zdroj vody (např. vodovodní voda nebo filtrovaná voda) a dodávka (potrubím z velké nádrže, v lahvích apod.),
- stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),
- záznam o podmínkách chovu v kleci, interval osvětlení, teplota a vlhkost v místnosti, úklid místnosti,
- podrobný popis postupů pitvy a vážení dělohy,
- popis statistických postupů.

Výsledky*U jednotlivých zvířat:*

- všechny denní tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat (od přidělení do skupin až do pitvy) (s přesností na 0,1 g),
- věk každého zvířete (ve dnech, den narození se počítá jako den 0) při zahájení podávání zkoušené chemické látky,
- datum a čas podání každé dávky,
- vypočtený objem a velikost podávaných dávek a pozorování ztrát látky během podávání nebo po podání,
- denní záznamy o stavu zvířete, včetně významných příznaků a pozorování,
- předpokládaná příčina smrti (pokud byla zvířata během studie nalezena ve stavu agónie nebo uhynulá),
- datum a čas humánního usmrcení s časovým intervalem od posledního podání dávky,
- hmotnost dělohy ve vlhkém stavu (s přesností na 0,1 mg) a jakékoli zjištěné ztráty lumenální tekutiny během sekce a přípravy na vážení,
- hmotnost dělohy ve vysušeném stavu (s přesností na 0,1 mg).

U každé skupiny zvířat:

- průměrná denní tělesná hmotnost (s přesností na 0,1 g) a směrodatná odchylka (od přiřazení ke skupinám až do pitvy),
- průměrná hmotnost vlhké dělohy a průměrná hmotnost usušené dělohy (s přesností na 0,1 mg) a směrodatné odchylky,
- denní spotřeba potravy, je-li měřena (vypočítaná jako gramy spotřebované potravy na každé zvíře),
- výsledky statistických analýz srovnávajících hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu u experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem,
- výsledky statistické analýzy srovnávající celkovou tělesnou hmotnost a přírůstek tělesné hmotnosti experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem.

53. Shrnutí důležitých aspektů zkušební metody, které mohou sloužit jako vodítko

	Potkani	Myši
Zvířata		
Kmen	Běžně užívaný kmen laboratorních hlodavců	
Počet zvířat	Nejméně 6 zvířat v každé exponované skupině	
Počet skupin	Nejméně 2 zkušební skupiny (viz pokyny v odstavci 33) a 1 skupina negativní kontroly Pokyny týkající se skupin pozitivní kontroly viz odstavec 26 a 27)	
Podmínky chovu a krmení		
v místnosti pro zvířata	22 °C ± 3 °C	
Relativní vlhkost	50–60 %, nejméně 30 % a nejvýše 70 %	
Denní střídání osvětlení	12 hodin světla, 12 hodin tmy	
Strava a pitná voda	Ad libitum	

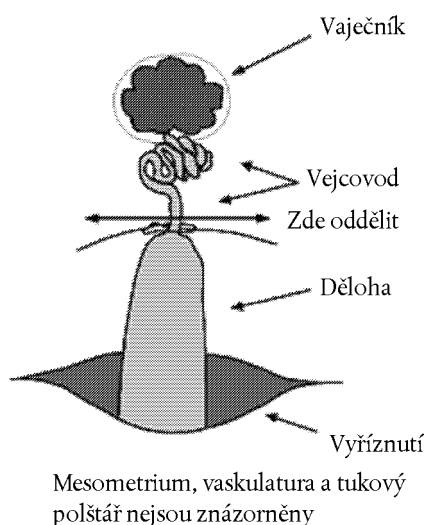
	Potkani	Myši
Chov	Jednotlivě nebo ve skupinách až do tří zvířat (u nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách)	
Strava a stelivo	Doporučuje se nízká úroveň fytoestrogenů ve stravě a stelivu	
Postup		
Metoda	Metoda s nezralými zvířaty bez odstranění vaječníků (upřednostňovaná metoda) Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky	Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky
Věk podávání dávek u nezralých zvířat	Nejdříve v 18. postnatální den. Podávání by mělo být ukončeno před 25. postnatálním dnem.	V rámci stávající zkušební metody není relevantní.
Věk odstranění vaječníků	6. až 8. týden věku.	
Věk podávání dávek u zvířat s odstraněnými vaječníky	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 14 dnů.	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 7 dnů.
Tělesná hmotnost	Rozdíly v tělesné hmotnosti by měly být minimální a od střední hmotnosti by se měly lišit nejvýše o ± 20 %.	
Dávkování		
Způsob podání	Orální sondou nebo subkutánní injekcí.	
Četnost podávání	Jedna denní dávka	
Objem látky pro sondu nebo injekci	≤ 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti (nebo až 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti v případě vodného roztoku) (ve 2 injekcích při subkutánním způsobu)	
Trvání podávání	3 po sobě jdoucí dny u modelu s nezralými Nejméně 3 po sobě jdoucí dny u modelu s odstraněnými vaječníky	7 po sobě jdoucích dnů u modelu s odstraněnými vaječníky
Doba pitvy	Přibližně 24 hodin po poslední dávce	
Výsledky		
Pozitivní reakce	Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy (ve vlhkém a/nebo ve vysušeném stavu)	
Referenční estrogen	17-alfa-ethinylestradiol	

POKYNY PRO INTERPRETACI A PLATNOST VÝSLEDKŮ

54. Obecně by zkouška estrogenity měla být považována za pozitivní, jestliže existuje statisticky významné zvýšení hmotnosti dělohy ($p < 0,05$) přinejmenším při vysoké úrovni dávky v porovnání s kontrolní skupinou vystavenou pouze působení rozpouštědla. Pozitivní výsledek je dále podpořen prokázáním biologicky přijatelného vztahu mezi dávkou a velikostí odezvy s přihlédnutím k tomu, že tvar křivky dávka-odpověď může ovlivnit překrývající se estrogenní a antiestrogenní působení zkoušené chemické látky.
55. Musí se dbát na to, aby nebyla překročena maximální tolerovaná dávka, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a jakékoli další nálezy.

56. Důležitým faktorem pro přijetí údajů získaných při uterotrofní biologické zkoušce jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině s vehikulem. Vysoké kontrolní hodnoty mohou zpochybnit citlivost biologické zkoušky a schopnost odhalit velmi slabé agonisty estrogenu. Literární rešerše a údaje získané při validaci uterotrofní biologické zkoušky naznačují, že k případům vysokých kontrolních hodnot dochází spontánně, zejména u nezralých zvířat (2)(3)(6)(9). Jelikož hmotnost dělohy nezralých potkanů závisí na mnoha proměnných, jako je kmen nebo tělesná hmotnost, nelze pro hmotnost dělohy s konečnou platností stanovit žádnou horní hranici. Jako určité vodítko může posloužit, že pokud jsou hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u nezralých potkanů v kontrolní skupině v rozmezí 40 až 45 mg, měly by být výsledky považovány za podezřelé, a hmotnosti dělohy vyšší než 45 mg mohou vést k provedení nové zkoušky. Toto však musí být zváženo v každém jednotlivém případě (3)(6)(8). Při zkouškách s dospělými potkany neúplné odstranění vaječníků ponechává vaječnickovou tkáň, která může produkovat endogenní estrogen a brzdí návrat hmotnosti dělohy do původního stavu.
57. Hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u zvířat z kontrolní skupiny s vehikulem, které jsou nižší než 0,09 % tělesné hmotnosti pro nezralé samice potkana a nižší než 0,04 % tělesné hmotnosti pro mladé dospělé samice s odstraněnými vaječníky, podle všeho znamenají přijatelné výsledky [viz tabulka 31 (2)]. Jestliže jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině vyšší než tyto hodnoty, měly by být přezkoumány různé faktory včetně věku zvířat, řádného odstranění vaječníků, obsahu fytoestrogenů ve stravě atd. a negativní výsledky zkoušky (žádné příznaky estrogenní aktivity) by měly být používány s obezřetností.
58. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční estrogény, jako je 17-alfa-ethinylestradiol. Laboratoře též mohou zkoušet reakce na známé slabé agonisty estrogenu. Všechny tyto údaje je možné porovnat s dostupnými údaji (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), aby bylo zaručeno, že metody používané laboratoří zajišťují dostatečnou citlivost.
59. Hmotnosti děloh ve vysušeném stavu v průběhu validační studie OECD vykazovaly menší variabilitu než hmotnosti děloh ve vlhkém stavu (6)(7). Výrazná reakce při kterémkoli měření by však ukazovala na to, že zkoušená chemická látka je z hlediska estrogenního působení pozitivní.
60. Uterotrofní reakce není zcela estrogenního původu, avšak pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky by obecně měl být interpretován jako důkaz estrogenního potenciálu *in vivo* a měl by normálně vyvolat kroky směřující k dalšímu vyjasnění (viz odstavec 9 a 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals', příloha 2).

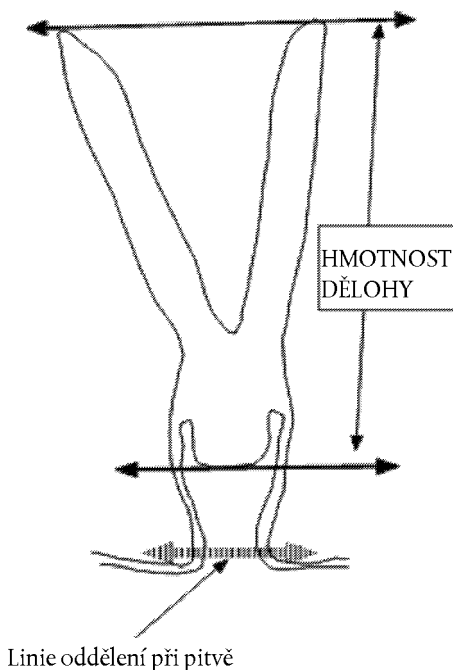
Obrázek 1

Schematický diagram ukazující chirurgické odstranění vaječníků

Postup začíná otevřením dorzo-laterální stěny břišní ve středním bodě mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní, několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Uvnitř břišní dutiny by měly být umístěny vaječníky. Na aseptickém poli se vaječníky poté fyzicky oddělí od břišní dutiny, mezi vaječník a dělohu se umístí

podvaz za účelem kontroly krvácení a vaječník se nad podvazem oddělí řezem ve spojení vejcovodu s každým děložním rohem. Po ujištění, že nepřetrvává žádné výrazné krvácení, se břišní stěna uzavře suturou a kůže se uzavře např. klipy nebo suturou. Zvířatům by mělo být umožněno zotavení a návrat hmotnosti dělohy do původního stavu po dobu nejméně 14 dnů před použitím.

Obrázek 2

Odstranění a zpracování děložních tkání pro měření hmotnosti

Postup začíná otevřením břišní stěny ve srůstu stydké kosti. Poté se od dorzální břišní stěny oddělí každý z vaječníků, jsou-li přítomny, a roh dělohy. Od ventrální a laterální strany dělohy a vaginy se oddělí močový měchýř a močovody. Odděluje se fibrózní adheze mezi rektum a vaginou, dokud nelze identifikovat spojení poševního vchodu s perineální kůží. Děloha a vagina se oddělí od těla naříznutím poševní stěny těsně nad spojením mezi perineální kůží, jak je ukázáno na obrázku. Děloha by měla být oddělena od bočního svalstva jemným odříznutím děložního okruží v bodě jeho připojení po celé délce dorzálně laterálního aspektu každého děložního rohu. Po oddělení od těla se odstraní přebytečný tuk a spojovací tkáň. Jsou-li přítomny vaječníky, oddělí se ve vejcovodu, aby nedošlo ke ztrátě lumenální tekutiny z děložního rohu. Pokud byly zvířeti vaječníky odstraněny, měly by se vyšetřit pahýly, zda nejsou přítomny tkáně vaječníků. Vagina se oddělí od dělohy těsně pod děložním hrdlem, takže hrdlo zůstane s tělem dělohy, jak je ukázáno na obrázku. Poté lze dělohu zvážit.

Dodatek 1

DEFINICE

Antiestrogenita: je schopnost chemické látky potlačit působení 17-beta-estradiolu v organismu savců.

Citlivost: je podíl všech pozitivních/účinných chemických látek, které jsou správně klasifikovány zkouškou. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Datum narození: je 0. postnatální den.

Dávkování: je obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

Dávka: je množství podané zkoušené chemické látky. U uterotrofní biologické zkoušky je dávka vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zkušebního zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den).

Estrogenita: je schopnost chemické látky působit jako 17-beta-estradiol v organismu savců.

Chemická látka: znamená látku nebo směs.

Maximální tolerovaná dávka (MTD): je nejvyšší množství chemické látky, které, je-li zavedeno do těla, zkušební zvířata neusmrtí (označuje se jako LD₀) (IUPAC, 1993).

Specifičnost: je podíl všech negativních/neúčinných chemických látek, které jsou správně zkouškou klasifikovány. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává jednoznačné výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Uterotrofní: je termín používaný k popisu pozitivního vlivu na růst děložních tkání.

Validace: je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevanci pro určitý konkrétní cíl.

X. postnatální den: je x-tý den života po dni narození.

Zkoušená chemická látka: znamená jakoukoli látku nebo směs zkoušenou touto zkušební metodou.

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebních pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedání pracovní skupiny EDTA

OECD Koncepční rámec pro zkoušky a hodnocení endokrinních disruptorů

Úroveň 1 Trídění a prioritizace na základě stávajících informací	— Fyzikální a chemické vlastnosti, např. MW, reaktivita, volatilita, biologická rozložitelnost, — Expozice lidí a životního prostředí, např. Objem výroby, uvolňování, vzorce užívání — Nebezpečí, např. dostupné toxikologické údaje
Úroveň 2 Zkoušky <i>in vitro</i> poskytují mechanistické	— Afinita vázání receptoru ER, AR, TR — Transkripční aktivace — Aromatáza a steroidogeneze <i>in vitro</i> — Vázání/rozpoznání receptoru aryluhlovodiků — QSAR — Vysoce výkonné předběžné screeniny — Funkce štítné žlázy — VTG zkouška rybích hepatocytů — Jiné (dle možnosti)
Úroveň 3 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o jednotlivých endokrinních mechanismech a účincích	— Uterotrofiní zkouška (estrogenová souvislost) — Hershbergerova zkouška (androgenní souvislost) — Nereceptorová zprostředkovaná funkce hormonu — Jiné (např. Štítná žláza) — Zkouška rybiho VTG (vitellogenin) (estrogenová souvislost)
Úroveň 4 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o mnohočetných endokrinních mechanismech a účincích	— Vylepšený pokyn OECD 407 (cílové parametry na základě endokrinních mechanismů) — Zkoušky období dospívání samců a samic — Zkoušky intaktních dospělých samců — Zkouška histopatologie pohlavních žláz ryb — Zkouška metamorfozy žab
Úroveň 5 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o účincích endokrinních a jiných mechanismů	— Jednogeneční zkouška (TG415, vylepšená)¹ — Dvougeneční zkouška (TG416 vylepšená)¹ — Reprodukční screeningový (TG421 vylepšený)¹ — kombinovaný 28 denní/reprodukční screeningový test (TG 422 vylepšený)¹ ¹ Případná vylepšení budou zvažována v rámci VMG mamm — Zkoušky částečného a celého životního cyklu u ryb, ptáků, obojživelníků a bezobratlých (vývojové a reprodukce)

VMG mamm: Skupina pro řízení validace zkoušek prováděných na savcích

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

- Poznámka 1:** Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.
- Poznámka 2:** Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.
- Poznámka 3:** Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.
- Poznámka 4:** Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.
- Poznámka 5:** Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímne. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.
- Poznámka 6:** U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

LITERATURA

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- 3) Owens, J.W., Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32, 445–520.
- 4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- 5) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., Owens, W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109, 785–94.
- 6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- 7) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111, 1530–1549.
- 8) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111, 1550–1558.
- 9) Owens, W., Ashby, J., Odum, J., Onyon, L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111, 1559–1567.
- 10) Ogasawara, Y., Okamoto, S., Kitamura, Y., Matsumoto, K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113, 582–587.
- 11) Branham, W.S., Sheehan, D.M., Zehr, D.R., Ridlon, E., Nelson, C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117, 2229–2237.
- 12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerkel, K., Lichtensteiger, W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127, 10–15.

- 13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., Shoger, R.L. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science*, 118, 650–651.
- 14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Saba, N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13, 425–427.
- 15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., Makela, S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106, 369–373.
- 16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67.
- 17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M.. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128, 145–157.
- 18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., Curran, I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1517–1525.
- 19) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Wada, T., Hara, T., Takatsuki, M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76, 613–620.
- 20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., Forsythe, D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53, 477–485.
- 21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., Boyle, C.C. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20, 343–347.
- 22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Haseman, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., Forsythe, D.B. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26, 381–393.
- 23) Thigpen, J.E., Li, L.-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., Jameson, C.W. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37, 596–601.
- 24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 425, Paris.
- 25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85, 320–333.
- 28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19, 33–41.
- 29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34, 288–305.
- 30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24, 284–291.
- 31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- 32) Dorfman, R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- 33) Thigpen, J.E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4), 401–416.

- 34) Gray, L.E. and Ostby, J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14(1–2), 159–184.
- 35) Booth, A.N., Bickoff, E.M. and Kohler, G.O. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science*, 131, 1807–1808.
- 36) Kato, H., Iwata, T., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., Iguchi, T. (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410–1414.
- 37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- 38) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. *Úř. věst.* L 276, 20.10.2010, s. 33.

B.55. HERSHBERGEROVA BIOLOGICKÁ ZKOUŠKA NA POTKANECH: KRÁTKODOBÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA ANDROGENNÍCH/ANTIANDROGENNÍCH VLASTNOSTÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 441 (2009). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat zkušební zásady pro provádění Hershbergerovy biologické zkoušky na potkanech. Po několika desetiletích využívání ve farmaceutickém odvětví byla tato zkouška poprvé standardizována oficiálním expertním výborem v roce 1962 jakožto nástroj pro zjišťování androgenních chemických látek (2). V letech 2001–2007 prošla Hershbergerova biologická zkouška na potkanech rozsáhlým validačním programem, jehož součástí mimo jiné bylo vytvoření Základního hodnotícího dokumentu (23), sestavení podrobného metodického listu (3), vypracování návodu pro pitvu (21) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií za účelem prokázání spolehlivosti a reprodukovatelnosti této biologické zkoušky. Tyto validační studie byly provedeny s účinným referenčním androgenem (testosteron propionát (TP)), dvěma účinnými syntetickými androgeny (trenbolon acetát a methylestosteron), účinnou antiandrogenní farmaceutickou látkou (flutamid), účinným inhibitorem syntézy (finasterid) přírodního androgenu (dihydrotestosteron (DHT)), několika slabými antiandrogenními pesticidy (linuron, vinklozolin, procymidon, p,p'-DDE), účinným inhibitorem 5-alfa-reduktázy (finasterid) a dvěma známými negativními chemickými látkami (dinitrofenol a nonylfenol) (4)(5)(6)(7)(8). Tato zkušební metoda je výsledkem dlouholetých historických zkušeností s touto biologickou zkouškou a zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z jejich výsledků.
2. Hershbergerova biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška *in vivo* s použitím přídatných tkání samčího reprodukčního traktu. Zkouška vznikla ve 30. letech 20. století a byla ve 40. letech pozměněna tak, aby zahrnovala svaly v samčím reprodukčním traktu reagující na androgeny (2) (9–15). V 60. letech bylo pomocí standardizované verze protokolu hodnoceno více než 700 možných androgenů (2)(14) a použití této zkoušky bylo v 60. letech považováno za standardní metodu zjišťování androgenních i antiandrogenních látek (2)(15). Stávající biologická zkouška je založena na změnách v hmotnosti pěti tkání závislých na androgenech u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Hodnotí schopnost chemické látky vyvolat biologické aktivity odpovídající agonistům a antagonistům androgenů a inhibitorům 5-alfa-reduktázy. Pět cílových tkání závislých na androgenech, které jsou zahrnuty do této zkušební metody, jsou ventrální prostata (VP), semenný váček (SV) (spolu s tekutinami a koagulačními žlázami), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), pár Cowperových žláz (COW) a žalud penisu (GP). U kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období všech těchto pět tkání reaguje na androgeny růstem absolutní hmotnosti. Jsou-li tytéž tkáně podáváním účinného referenčního androgenu stimulovány k nárůstu hmotnosti, na antiandrogeny všech těchto pět tkání reaguje snížením absolutní hmotnosti. Primárním modelem pro Hershbergerovu biologickou zkoušku byl chirurgicky kastrovaný samec v peripubertálním období, což bylo validováno ve fázi 1, 2 a 3 programu validace Hershbergerovy zkoušky.
3. Hershbergerova biologická zkouška slouží jako mechanistická screeningová zkouška ke zjišťování agonistů androgenů, antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo* a její provedení je nutno posuzovat v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (dodatek 2). V tomto koncepčním rámci je Hershbergerova biologická zkouška zařazena na úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jednom endokrinním mechanismu, tj. androgenitě/antiandrogenitě. Předpokládá se její zařazení do série zkoušek *in vitro* a *in vivo*, jejichž účelem je zjišťování chemických látek schopných interakce s endokrinním systémem a které v konečném důsledku vedou k posouzení nebezpečí a rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí.

4. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty byl v souvislosti s kastrací pro Hershbergerovu biologickou zkoušku hledán alternativní model s využitím intaktních (nekastrovaných) stimulovaných odstavených mláďat, aby bylo možno se vyhnout kroku kastrace. Zkušební metoda se stimulovanými odstavenými mláďaty byla podrobena validaci (24); při validačních studiích se však ukázalo, že verze Hershbergerovy biologické zkoušky s odstavenými mláďaty nebyla schopna při zkoušených dávkách stabilně detekovat účinky slabých antiandrogenů na hmotnost orgánů závislých na androgenech. Proto nebyla do této zkušební metody zařazena. Uznává se však, že její použití může být prospěšné nejen z hlediska dobrého zacházení se zvířaty, ale může také poskytnout informace o jiných způsobech působení a je k dispozici v Pokynech OECD č. 115 (25).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Agonisté a antagonisté androgenů působí jako ligandy na receptor androgenů a mohou aktivovat (agonisté) nebo potlačovat (antagonisté) transkripci genů, kterou tento receptor kontroluje. Některé chemické látky kromě toho potlačují přeměnu testosteronu na více účinný přirozený androgen, dihydrotestosteron, v některých androgenních cílových tkáních (inhibitory 5-alfa-reduktázy). Působení takových chemických látek může vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje regulační potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty androgenů nebo inhibitoru 5-alfa-reduktázy. Afinita ligandu k androgennímu receptoru měřená vazbou na receptor nebo aktivací transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, není jediným určujícím faktorem možného nebezpečí. Jinými určujícími faktory jsou např. aktivace a deaktivace metabolismu po vstupu do organismu, distribuce chemické látky do cílových tkání a vymizení z těla. Proto je potřeba zjišťovat možné aktivity chemické látky *in vivo* za příslušných podmínek a expozice. Hodnocení *in vivo* má méně zásadní význam, jsou-li známy typické znaky absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME) dané chemické látky. Tkáně závislé na androgenech reagují na stimulaci androgeny rychlým a mohutným růstem, zejména u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Druhy hlodavců, zejména potkan, jsou široce používány také ve studiích toxicity pro charakterizaci nebezpečnosti chemických látek. Proto je verze zkoušky používající kastrované potkany v peripubertálním věku a pět cílových tkání vhodná pro zjišťování agonistů a antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo*.
6. Tato zkušební metoda je založena na těch zkušebních postupech použitých při validační studii OECD, u kterých byla při vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studiích prokázána jejich spolehlivost a reprodukovatelnost. V této zkušební metodě jsou prezentovány jak androgenní, tak antiandrogenní postupy.
7. V dávce TP použité jednotlivými laboratořemi v rámci programu OECD pro validaci Hershbergerovy biologické zkoušky se vyskytla určitá odchylka (0,2 mg oproti 0,4 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den, při podávání subkutánní injekcí), avšak obě tyto varianty protokolu se jen málo lišily ve schopnosti detekovat slabou či silnou antiandrogenní aktivitu. Je však jasné, že dávka TP by neměla být příliš vysoká, aby neblokovala účinek slabých antagonistů androgenového receptoru, ani tak nízká, aby androgenní tkáně i bez spolupodávání antiandrogenů vykazovaly slabou růstovou reakci.
8. Růstová reakce jednotlivých tkání závislých na androgenech není zcela androgenního původu, tj. hmotnost určitých tkání mohou změnit i jiné chemické látky než agonisté androgenů. Avšak růstová reakce některých tkání je doprovodným jevem specifitějšího působení androgenního mechanismu. Například vysoké dávky účinných estrogenů mohou zvýšit hmotnost semenných váčků; jiné tkáně závislé na androgenech však při studii podobným způsobem nereagovaly. Antiandrogenní chemické látky mohou působit buď jako antagonistní látky androgenních receptorů, nebo jako inhibitory 5-alfa-reduktázy. Inhibitory 5-alfa-reduktázy mají variabilní účinek, protože přeměna na více účinný dihydrotestosteron se liší podle jednotlivých tkání. Antiandrogeny potlačující 5-alfa-reduktázu, např. finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně, na rozdíl od účinného antagonisty androgenního receptoru, jako je flutamid. Tato rozdílná reakce tkání může být využita pro rozlišení mezi způsoby působení zprostředkovanými androgenním receptorem a působení zprostředkovaného 5-alfa-reduktázou. Androgenní receptor kromě toho vývojově souvisí s receptory jiných steroidních hormonů a některých dalších hormonů, které, jsou-li podávány na vysokých, suprafyziologických úrovních dávkování, mohou vázat a antagonizovat účinky TP podporující růst. Dále je také reálné, že zesílený steroidní metabolismus a následné snížení testosteronu v séru by mohly růst tkání závislých na androgenech oslabit. Jakýkoli pozitivní výsledek Hershbergerovy biologické zkoušky by proto měl být normálně hodnocen metodou posuzování závažnosti všech dostupných údajů, včetně zkoušek *in vitro*, jako jsou zkoušky vazby receptorů androgenů a receptorů estrogenů a zkoušky odpovídající transkripční aktivace, nebo údajů z jiných zkoušek *in vivo*, které zkoumají podobné androgenní cílové tkáně, jako jsou zkoušky na samcích v pubertálním věku, 15denní studie na intaktních dospělých samcích nebo 28denní či 90denní studie s opakovanými dávkami.

9. Zkušební metody ukazují, že xenobiotické androgeny jsou vzácnější než xenobiotické antiandrogeny. Předpokládá se tedy, že Hershbergerova biologická zkouška se bude nejčastěji používat pro zjišťování antiandrogenů. Nicméně postup pro zkoušení androgenů by se měl používat u steroidů nebo steroidům podobných chemických látek nebo u chemických látek, kde byly známky možných androgenních účinků zjištěny metodami uvedenými uvedených na úrovni 1 nebo 2 koncepčního rámce (dodatek 2). Podobně mohou být nepříznivé účinky spojené s androgenními/antiandrogenními profily pozorovány při zkouškách na úrovni 5, což by mělo vést k posouzení, zda určitá chemická látka působí endokrinně.
10. Uznává se, že veškeré postupy založené na zvířatech by měly splňovat místní normy v oblasti péče o zvířata; popisy péče a zacházení, které jsou stanoveny níže, jsou minimální výkonnostní normy a budou nahrazeny místními předpisy, např. směrnici Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (17).
11. Jako při každé biologické zkoušce, při které jsou použita zkušební zvířata, by se mělo pečlivě zvážit, zda je nezbytné tuto studii provádět. Pro takové rozhodnutí mohou být v zásadě dva důvody:
 - vysoká možnost expozice (úroveň 1 koncepčního rámce) nebo příznaky androgenity/antiandrogenity zjištěné při zkouškách *in vitro* (úroveň 2), kdy by se následně mělo zjistit, zda takové účinky mohou nastat *in vivo*,
 - účinky odpovídající androgenitě/antiandrogenitě zjištěné při zkouškách *in vivo* na úrovni 4 nebo 5, kdy by se měl dále zkoumat specifický způsob účinku, to jest stanovit, zda účinky byly vyvolány androgenním/antiandrogenním mechanismem.
12. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

13. Hershbergerova biologická zkouška dosahuje své citlivosti díky použití samců s minimální endogenní produkcí androgenů. Toho je dosaženo použitím kastrováných samců za předpokladu, že po kastraci se poskytne dostatek času, aby se cílové tkáně mohly vrátit k minimální a jednotné výchozí hmotnosti. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity tak existují nízké endogenní úrovně cirkulujících androgenů, hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa není schopna prostřednictvím mechanismů zpětné vazby zajistit kompenzaci, maximalizuje se reaktivní schopnost tkání a minimalizuje se variabilita výchozích hmotností tkání. Při zjišťování potenciální antiandrogenní aktivity lze dosáhnout stabilnějšího přírůstku hmotnosti tkání, jsou-li tkáně stimulovány referenčním androgenem. Vzhledem k uvedeným skutečnostem Hershbergerova biologická zkouška vyžaduje pouze 6 zvířat v každé exponované skupině, zatímco při jiných zkouškách s intaktními pubertálními nebo dospělými samci se doporučuje použít 15 samců v každé exponované skupině.
14. Kastrace samců potkanů v peripubertálním období by měla být provedena vhodným způsobem, s použitím schválených anestetik a aseptickou technikou. Několik prvních dnů po operaci by měla být podávána analgetika s cílem eliminovat pooperační utrpení. Pokud jde o detekci slabých androgenů a antiandrogenů, kastrace zvyšuje přesnost zkoušky tím, že vyřazuje kompenzační mechanismy endokrinní zpětné vazby přítomné u intaktního zvířete, které mohou účinky podávaných androgenů a antiandrogenů oslabit, a odstraňuje značné rozdíly v úrovni testosteronu v séru jednotlivých zvířat. Kastrace tedy snižuje počet zvířat požadovaný pro zjištění těchto endokrinních aktivit.
15. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity se zkoušená chemická látka podává denně orální sondou nebo subkutánní injekcí po dobu deseti po sobě jdoucích dnů. Zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálními skupinám zkušebních zvířat, přičemž každé skupině je aplikována jiná úroveň dávky. Přibližně po 24 hodinách od poslední dávky se zvířata podrobí pitvě. Statisticky významný nárůst hmotnosti dvou nebo více cílových orgánů ve skupinách, jimž byla podávána zkoušená chemická látka, v porovnání s kontrolní skupinou s vehikulem ukazuje, že zkoušená chemická látka je z hlediska potenciální androgenní aktivity pozitivní (viz odstavec 60). Androgeny, jako například trenbolon, které nemohou být redukovány 5-alfa-reduktázou, mají výraznější účinek na LABC a GP, než má TP, avšak zvýšený růst by měly vykazat všechny tkáně.
16. Při zjišťování potenciální antiandrogenní aktivity se zkoušená chemická látka podává denně orální sondou nebo subkutánní injekcí po dobu deseti po sobě jdoucích dnů souběžně s denními dávkami TP (0,2 mg nebo 0,4 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den) aplikovanými subkutánní injekcí. Při validačním programu bylo stanoveno, že

mohou být použity dávky TP buď 0,2 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den, nebo 0,4 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den, neboť při detekci antiandrogenů byly účinné obě tyto hodnoty, a pro použití při zkoušce by proto měla být vybrána pouze jedna z těchto dávek. Odstupňované dávky zkoušené chemické látky se podávají nejméně třem experimentálním skupinám pokusných zvířat, přičemž každé skupině je aplikována jiná úroveň dávky. Přibližně po 24 hodinách od poslední dávky se zvířata podrobí pitvě. Statisticky významný pokles hmotností dvou nebo více cílových orgánů ve skupinách, jimž byla podávána zkoušená chemická látka spolu s TP, v porovnání s kontrolní skupinou, které byl podáván pouze TP, ukazuje, že zkoušená chemická látka je z hlediska potenciální antiandrogenní aktivity pozitivní (viz odstavec 61).

POPIS METODY

Výběr druhu a kmene

17. Od 30. let 20. století je při Hershbergerově biologické zkoušce běžně používán potkan. Ačkoli je z biologického hlediska možné, že potkan i myš by vykazaly podobné reakce, je na základě 70letých zkušeností s modelem potkanů pro Hershbergerovu biologickou zkoušku upřednostňovaným druhem potkan. Navíc, jelikož údaje získané při Hershbergerově biologické zkoušce mohou být předběžnými údaji pro dlouhodobou vícegenerační studii, je možné použít při obou studiích zvířata stejného druhu, kmene a původu.
18. Tento zkušební postup umožňuje, aby si laboratoř pro použití v této zkoušce vybrala kmen potkanů, který by obecně měl být stejný jako kmen historicky používaný v této laboratoři. Použity mohou být běžně používané kmeny laboratorních potkanů; neměly by však být použity kmeny, které pohlavně dozrávají výrazně později než ve věku 42 dnů, jelikož kastrace těchto samců ve věku 42 dnů věku by mohla znemožnit měření hmotnosti žaludu penisu, které může být provedeno teprve po odpojení předkožky od těla penisu. Neměly by tedy, až na vzácné případy, být použity kmeny odvozené od potkanů Fisher 344. Potkani Fisher 344 mají jiný časový průběh pohlavního vývoje než jiné, běžněji používané kmeny, např. kmeny Sprague Dawley nebo Wistar (16). Má-li být takový kmen použit, měla by laboratoř tato zvířata kastrovat v poněkud pozdějším věku a měla by být schopna prokázat citlivost použitého kmene. Výběr kmene potkanů by laboratoř měla jasně zdůvodnit. Tam, kde screeningová zkouška může být předběžnou studií pro studii s opakovaným podáváním dávky orální cestou, pro reprodukční a vývojovou studii nebo pro dlouhodobou studii, měla by být ve všech studiích přednostně používána zvířata stejného kmene a původu.

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat všem místním normám péče o laboratorní zvířata. Tyto popisy péče a zacházení jsou minimálními normami a budou nahrazeny přísnějšími místními nařízeními, např. směrnici Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem musí být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy.
20. Skupinový chov se upřednostňuje před izolací vzhledem k mladému věku zvířat a ke skutečnosti, že potkani jsou společenská zvířata. Chov po dvou nebo třech zvířatech v každé kleci zamezí stísněným podmínkám a s nimi spojenému stresu, který může ovlivnit hormonální kontrolu vývoje přídatné tkáně pohlavních orgánů. Klece by měly být pečlivě čistěny, aby se odstranily možné kontaminující látky, a uspořádány tak, aby byl možný vliv umístění klecí minimalizován. Klece náležité velikosti ($\sim 2\,000\text{ cm}^2$) zabrání stísněným podmínkám.
21. Každé zvíře musí být jednotlivě označeno (např. ušní známkou nebo štítkem) humánním způsobem. Metoda označení se zaznamená.
22. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata v libovolném množství. Laboratoře provádějící Hershbergerovu biologickou zkoušku by měly používat laboratorní stravu, kterou běžně používají při své práci zkoušení chemických látek. Při validačních studiích pro tuto biologickou zkoušku nebyly pozorovány žádné účinky nebo variability, které by bylo možné přičíst stravě. Použitá strava se zaznamená a vzorek laboratorní stravy se uchová pro případnou budoucí analýzu.

Kritéria hmotnosti orgánů závislých na androgenech

23. Během validační studie nebyly získány žádné poznatky, že by pokles tělesné hmotnosti ovlivnil zvýšení nebo snížení růstu hmotnosti cílových tkání (tj. těch, které by se při této studii měly vážit).

24. Z jednotlivých kmenů potkanů, které byly úspěšně použity v rámci validačního programu, vykazují těžší kmeny potkanů vyšší hmotnosti orgánů závislých na androgenech než lehčí kmeny. Proto kritéria pro Hershbergerovu biologickou zkoušku neobsahují absolutní očekávané hmotnosti orgánů pro pozitivní a negativní kontrolní skupiny.
25. Vzhledem k existenci vztahu nepřímé úměry mezi variačním koeficientem (CV) pro určitou tkáň a statistickou vahou údajů, jsou kritéria Hershbergerovy biologické zkoušky založena na maximálních hodnotách variačního koeficientu pro každou tkáň (Tabulka 1). Variační koeficienty jsou odvozeny z validačních studií OECD. V případě negativních výsledků by laboratoře měly zkoumat variační koeficienty z kontrolní skupiny a z experimentální skupiny, které byly podávány vysoké dávky, a stanovit, zda nebyla překročena kritéria pro maximální variační koeficient.
26. Studie my měla být zopakována, pokud: 1) tři nebo více z deseti možných variačních koeficientů u jednotlivých zvířat v kontrolní skupině a ve skupině, které byly podávány vysoké dávky, překročí maximum stanovené pro studie agonistů a antagonistů uvedené v tabulce 1 a 2) nejméně dvě cílové tkáně byly marginálně insignifikantní, tj. hodnoty ρ byly mezi 0,05 a 0,10.

Tabulka 1

Maximální přípustné variační koeficienty stanovené pro cílové přídatné pohlavní tkáně u modelu kastrováných zvířat při validačních studiích OECD ⁽¹⁾

Tkáň	Antiandrogenní účinky	Androgenní účinky
Semenné vajíčky	40 %	40 %
Ventrální prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperovy žlázy	35 %	55 %
Žalud penisu	17 %	22 %

POSTUP

Dodržování právních předpisů a laboratorní ověření

27. Na rozdíl od uterotrofní zkoušky (kapitola B.54 této přílohy) není při Hershbergerově biologické zkoušce nutné před zahájením studie prokazovat způsobilost laboratoře, protože nedílnou součástí zkoušky je souběžné provádění pozitivní (testosteron propionát a flutamid) a negativní kontroly.

Počet a stav zvířat

28. Každá experimentální i kontrolní skupina by měla zahrnovat nejméně 6 zvířat. To platí pro androgenní i pro antiandrogenní protokol.

Kastrace

29. Po příjmu zvířat by mělo proběhnout počáteční aklimatizační období v trvání několika dní, aby se zajistilo, že zvířata jsou zdravá a prosperující. Jelikož zvířata kastrována před 42. dnem života nebo 42. postnatálním dnem nemusí mít oddělenou předkožku, měla by být kastrována v 42. postnatální den nebo později, ne však dříve. Kastrace zvířat se provádí v anestezii provedením řezu v šourku a odstraněním obou varlat a nadvarlat s podvázáním cév a chámovodů. Po ujištění, že nedochází ke krvácení, se šourek uzavře suturou nebo klipsy. Po několika dnech po operaci by zvířatům měla být podávána analgetika ke zmírnění pooperačního utrpení. Jsou-li od dodavatele zvířat nakupována kastrována zvířata, dodavatel by měl potvrdit jejich věk a stadium pohlavní zralosti.

⁽¹⁾ Prahový variační koeficient pro danou tkáň byl zjištěn z grafu hodnot variačního koeficientu – uspořádaných od nejmenších postupně až po nejvyšší – u všech průměrů ze všech experimentů v rámci validační studie pomocí specifického modelu (agonistní nebo antagonistní). Prahový variační koeficient byl vzat z bodu, od kterého přírůsteky mezi nejbližšími nejvyššími variačními koeficienty v řadě jsou dramaticky vyšší než několik předchozích variačních koeficientů – „bodu zlomu“. Je třeba poznamenat, že tato analýza určila poměrně spolehlivé „body zlomu“ u antagonistního modelu zkoušky, ale křivky variačních koeficientů u zkoušky agonistů vykazovaly pozvolnější růst, což činí určení prahového koeficientu touto metodou poněkud subjektivním.

Aklimatizace po kastraci

30. Po kastraci by zvířatům měla být poskytnuta další aklimatizace na laboratorní podmínky v trvání nejméně 7 dnů s cílem umožnit návrat hmotností cílových tkání do původního stavu. Zvířata by měla být denně pozorována a všechna zvířata s příznaky nemoci nebo fyzických abnormalit se odstraní. Expozice s podáváním dávek (v rámci studie) tak může začít již v 49. postnatální den, avšak nejpozději v 60. postnatální den. Věk při pitvě by neměl být vyšší než 70. postnatální den. Tato pružnost umožňuje laboratorní efektivně naplánovat experimentální práci.

Tělesná hmotnost a náhodný výběr do skupin

31. Rozdíly v tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat jsou zdrojem variability v hmotnosti tkání v rámci skupin zvířat i mezi těmito skupinami. Rostoucí variabilita v hmotnosti tkání vede k vyššímu variačnímu koeficientu (CV) a snižuje statistickou váhu zkoušky (někdy označovanou jako citlivost zkoušky). Variace tělesné hmotnosti by proto měly být experimentálně i statisticky kontrolovány.
32. Experimentální kontrola zahrnuje dosažení malých variací tělesné hmotnosti v rámci studijních skupin a mezi těmito skupinami. Zaprvé, neobvykle malá nebo neobvykle velká zvířata by měla být vyloučena a neměla by být umísťována do studijní kohorty. Při zahájení studie by variace hmotnosti použitých zvířat neměla převyšovat $\pm 20\%$ střední hodnoty hmotnosti (např. $175 \text{ g} \pm 35 \text{ g}$ pro kastrované potkany v peripubertálním věku). Zadruhé, zvířata by měla být přiřazena do skupin (kontrolní a experimentální) náhodnou hmotnostní distribucí, takže střední hodnota tělesné hmotnosti každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Použitý postup blokové randomizace je třeba zaznamenat.
33. Jelikož toxicita může snížit tělesnou hmotnost exponovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou, mohla by jako statistický kovariát být použita tělesná hmotnost v první den podávání zkoušené chemické látky, a nikoli tělesná hmotnost při pitvě.

Dávkování

34. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít androgenní účinek *in vivo*, běžně postačují dvě skupiny exponované zkoušené chemické látce a dále pozitivní kontrolní skupina a negativní kontrolní skupina s vehikulem (viz odstavec 43). S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je upřednostňováno uvedené uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-reakce nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně 3 exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjišťování androgenní aktivity (např. odhad potence), měly by být zváženy odlišné režimy dávkování. Při zkoušce na antiandrogeny se zkoušená chemická látka podává spolu s referenčním agonistou androgenů. Měly by být použity nejméně 3 zkušební skupiny s různými dávkami zkoušené chemické látky a pozitivní a negativní kontrolní skupina (viz odstavec 44). S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, měla by kontrolní skupina dostávat vehikulum v nejvyšším objemu, jaký je použit ve zkušebních skupinách.
35. Při navrhování a výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla zaprvé zohlednit LD_{50} a/nebo informace o akutní toxicitě, aby se předešlo úmrtím, bolestivému strádání nebo utrpení zvířat (17)(18)(19)(20), a za druhé by měla zohlednit dostupné informace o dávkách použitých v subchronických a chronických studiích. Obecně by nejvyšší dávka neměla vyvolat snížení konečné tělesné hmotnosti zvířat o více než 10 % v porovnání s hmotností kontrolní skupiny. Nejvyšší dávka by měla být buď 1) nejvyšší dávka, která zaručuje přežití zvířat a která nezpůsobuje významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí 10 po sobě jdoucích dnů od podávání, až po maximální dávku 1 000 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den (viz odstavec 36), nebo 2) dávka vyvolávající androgenní/antiandrogenní účinky podle toho, která dávka je nižší. V rámci screeningu jsou přijatelné velké intervaly v dávkování, např. po 0,5 log (což odpovídá odstupňování dávky v intervalech po 3,2) nebo dokonce v jednotkách logaritmické škály. Nejsou-li žádné vhodné údaje dostupné, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozmezí dávek (viz odstavec 37), aby se podle ní stanovily dávky, které mají být použity ve vlastní studii.

Limitní dávka

36. Jestliže zkouška při limitní dávce 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den nebo nižší dávce s použitím postupů předepsaných pro tuto studii nepovede ke statisticky významné změně v hmotnostech reprodukčních orgánů, pak mohou být další úrovně dávek považovány za zbytečné. Limitní dávka se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Důvody pro zjištění rozmezí dávek

37. V případě nutnosti může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek na několika zvířatech s cílem zvolit vhodné exponované skupiny [pomocí metod pro zkoušení akutní toxicity (kapitola B.1.a, B.1.b této přílohy (27), OECD TG 425 (19)). V případě Hershbergerovy biologické zkoušky je cílem vybrat dávky, které zaručí přežití zvířat a nezpůsobí významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí deseti po sobě jdoucích dnů podávání chemické látky, až do limitní dávky 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den uvedené v odstavcích 35 a 36. V této souvislosti lze použít Pokyn OECD (17), který stanoví klinické příznaky toxicity nebo utrpení zvířat. Je-li to v rámci této předběžné studie po deseti dnech podávání proveditelné, lze přibližně po 24 hodinách od podání poslední dávky vyjmout cílové tkáně a zvážit je. Tyto údaje by pak mohly být podporně použity při výběru dávek pro hlavní studii.

Referenční chemické látky a vehikulum

38. Referenčním agonistou androgenů by měl být testosteron propionát (TP), č. CAS 57-82-5. Dávka referenčního TP může být 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti za den nebo 0,4 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Referenčním antagonistou androgenů by měl být flutamid (FT), č. CAS 1311-84-7. Dávka referenčního FT by měla být 3 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den a FT by měl být podáván spolu s dávkou referenčního TP.
39. Je-li to možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však mnohé androgenní ligandy nebo jejich metabolické prekursory mají tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/suspenze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit ve zkušebním vehikulu na konečnou pracovní koncentraci. Měly by být známy typické toxické znaky daného rozpouštědla a měly by být prověřeny na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stálou, lze jejímu rozpouštění napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být stanovena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden výchozí alikvotní podíl zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci a znehodnocení vzorků.

Podávání dávek

40. TP by měl být podáván subkutánní injekcí a FT by měl být podáván orální sondou.
41. Zkoušená chemická látka se podává orální sondou nebo subkutánní injekcí. Při výběru způsobu podávání musí být zohledněna zásada dobrého zacházení se zvířaty a fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky. Je-li dosaženo pozitivních výsledků pomocí injekce, před zahájením rozsáhlého, dlouhodobého zkoušení by měly být zohledněny také toxikologické aspekty, jako je relevantnost z hlediska způsobu expozice člověka dané chemické látky (např. orální sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), a existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při určitém způsobu podávání).
42. Dávky by měly být zvířatům podávány stejným způsobem a ve stejné časové posloupnosti po dobu deseti po sobě jdoucích dnů přibližně v 24hodinových intervalech. Úroveň dávek by měla být denně upravována na základě souběžně prováděných denních měření tělesné hmotnosti. Objem dávky a doba jejího podávání by v každém dni expozice měly být zaznamenány. Je zapotřebí dbát na to, aby nebyla překročena maximální dávka uvedená v odstavci 35, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a veškeré další nálezy. Při podávání orální sondou by měla být použita žaludeční sonda nebo vhodná intubační kanyla. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny v oblasti péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti. Při podávání subkutánní injekcí by dávky měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenávají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 0,5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Specifické postupy pro agonisty androgenů

43. Při zkoušce na agonisty androgenů je negativní kontrolní skupinou skupina s vehikulem a pozitivní kontrolní skupinou je skupina exponovaná TP. Biologická aktivita odpovídající agonistům androgenů je zkoušena podáváním zkoušené chemické látky experimentálním skupinám ve zvolených dávkách po dobu 10 po sobě jdoucích dnů. Hmotnosti pěti přídatných pohlavních tkání ze skupin, kterým byla podávána zkoušená chemická látka, se porovnávají se skupinou s vehikulem, zda existují statisticky významné přírůstky hmotnosti.

Specifické postupy pro antagonisty androgenů a inhibitory 5-alfa-reduktázy

44. Při zkoušce na antagonisty androgenů a inhibitory 5-alfa-reduktázy je negativní kontrolní skupinou skupina exponovaná TP a pozitivní kontrolní skupinou je skupina, které jsou společně podávány referenční dávky TP a FT. Biologická aktivita odpovídající antagonistům androgenů a inhibitorům 5-alfa-reduktázy je zkoušena podáváním referenční dávky TP a podáváním zkoušené chemické látky po dobu 10 po sobě jdoucích dnů. Hmotnosti pěti přídatných pohlavních tkání ze skupin, kterým byl podáván TP spolu se zkoušenou chemickou látkou, se porovnávají s referenční skupinou, které byl podáván pouze TP, zda existují statisticky významné poklesy hmotnosti.

POZOROVÁNÍ**Poznatky z klinického pozorování**

45. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Mělo by se provádět každý den nejlépe ve stejnou dobu (doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Proveďte se prohlídka všech zvířat za účelem zjištění úmrtnosti, nemocnosti a obecných klinických příznaků, jako jsou změny chování, změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání).
46. Všechna zvířata nalezená uhynulá se odeberou a odstraní bez další analýzy údajů. V záznamu o studii by měla být uvedena veškerá uhynutí zvířat před pitvou, spolu se zjevnými příčinami uhynutí. Zvířata v agónii se humánně utratí. Zvířata v agónii a následně usmrčená se uvedou v záznamu o studii, spolu se zjevnými příčinami nemocnosti.

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

47. Všechna zvířata by se měla denně zvážit s přesností na 0,1 g, přičemž první vážení by mělo být provedeno těsně před zahájením aplikace, tj. když jsou zvířata rozdělena do skupin. Alternativně lze změřit množství potravy spotřebované během doby aplikace na každou klec zvážením krmítek. Výsledky spotřeby potravy by měly být vyjádřeny v gramech na jednoho potkana za den.

Pitva a měření hmotnosti tkání a orgánů

48. Přibližně po 24 hodinách od posledního podání zkoušené chemické látky se potkani usmrtí, nechají vykrvácet v souladu s běžnými postupy provádějící laboratoře a provede se pitva. V závěrečné zprávě laboratoře by měla být uvedena metoda humánního usmrcení.
49. Ideálně by pořadí pitev mělo být určeno náhodným výběrem mezi skupinami, aby nedošlo k lineárnímu pořadí od nejméně exponované skupiny k nejvíce exponované skupině, či naopak, což by mohlo ovlivnit údaje. Veškeré pitevnické nálezy, tj. patologické změny/viditelné léze by měly být zaznamenány a uvedeny ve zprávě.
50. Zváží se pět tkání závislých na androgenech (ventrální prostata (VP), semenné vajíčky (SV), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), Cowperovy žlázy (COW), žalud penisu GP)), Tyto tkáně se vyříznou, opatrně zbaví nadbytečných ulpělých tkání a tuhu a stanoví se jejich hmotnost v čerstvém (nefixovaném) stavu. S každou tkání je nutno zacházet s obzvláštní pečlivostí, aby nedošlo ke ztrátě tekutin a aby nedošlo k vysychání, což může

způsobit významné chyby a variabilitu v důsledku snížení zaznamenávaných hmotností. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Je proto důležité, aby osoby provádějící pitvu přídatných pohlavních tkání byly obeznámeny se standardními postupy pitvání těchto tkání. K dispozici je příručka standardních operačních postupů (SOP) pro pitvu vydaná OECD (21). Pečlivý výcvik v souladu s příručkou minimalizuje potenciální zdroj variací ve studii. Za pitvu dané tkáně by měl být ideálně odpovědný tentýž pracovník, aby se zabránilo rozdílům ve zpracování tkání různými osobami. Není-li to možné, měla by být pitva uspořádána tak, že každý pracovník provádí sekci dané tkáně ze všech experimentálních skupin, a nikoli aby jedna osoba prováděla sekci všech tkání z kontrolní skupiny a někdo jiný byl odpovědný za exponované skupiny. Každá přídatná pohlavní tkáň se před osušením zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnosti naměřené u každého zvířete se zaznamenají.

51. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Z předchozí práce vyplynula řada variačních koeficientů (CV), které se podle všeho liší podle odborné způsobilosti té či oné laboratoře. V několika málo případech byly zjištěny velké rozdíly v absolutních hmotnostech tkání, např. VP a COW, v rámci jedné konkrétní laboratoře.
 52. Měření hmotnosti jater, párových ledvin a párových nadledvinek je volitelné. Tkáně by opět měly být zbaveny fascií adherens a tuku. Játra se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 g a párové ledviny a párové nadledvinky se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 mg. Játra, ledviny a nadledvinky jsou nejen ovlivněny androgeny; poskytují také užitečné důkazy systémové toxicity.
 53. Měření luteinizačního hormonu (LH), folikulárního stimulujícího hormonu (FSH) a testosteronu (T) v séru je fakultativní. Úroveň T v séru jsou užitečné pro stanovení, zda zkoušená chemická látka vyvolává metabolismus testosteronu v játrech a snižuje úroveň séra. Bez údajů o T by se takový účinek mohl jevit jako výsledek antiandrogenního mechanismu. Úroveň LH poskytují informace o schopnosti určitého antiandrogenu nejen snižovat hmotnost orgánů, ale také ovlivňovat hypothalamo-hypofyzární funkci, což při dlouhodobých studiích může vyvolávat nádory varlat. FSH je hormon důležitý pro spermatogenezi. Dobrovolná jsou rovněž měření séra T4 a T3, která mohou poskytnout užitečné doplňující informace o schopnosti narušovat homeostázu thyroideálních hormonů. Mají-li být prováděna hormonální měření, potkani se před pitvou anestetizují a odebere se jim krev srdeční punkcí, přičemž metoda anestezie by měla být pečlivě zvolena tak, aby neovlivnila hormonální měření. Metoda přípravy séra, zdroj souprav pro radioimunologický test nebo jiná měření, analytické postupy a výsledky se zaznamenají. Úroveň LH se zaznamenají v ng na 1 ml séra a rovněž hodnota T se uvede v ng na 1 ml séra.
 54. Pitva tkání je popsána dále, přičemž podrobný návod pro pitvu s fotografiemi byl zveřejněn v rámci validačního programu jako doplňující materiál (21). Na webových stránkách Korea Food and Drug Administration je k dispozici také videozáznam pitvy (22).
- Se zvířetem ve ventrální poloze určete, zda se předkožka penisu odpojila od žaludu. Pokud ano, stáhněte předkožku nazad a oddělte žalud, zvažte ho (s přesností na 0,1 mg) a hmotnost zaznamenejte.
 - Otevřete kůži na břiše a břišní stěnu, obnažte vnitřnosti. Pokud se provádí volitelné vážení dalších orgánů, oddělte játra a zvažte je s přesností na 0,1 g, oddělte žaludek a střevo, oddělte párové ledviny a párové nadledvinky a zvažte je s přesností na 0,1 mg. Touto sekci se obnaží močový měchýř a začíná sekce cílových samčích přídatných tkání.
 - Pro oddělení VP oddělte močový měchýř od vrstvy ventrálního svalu odříznutím spojovací tkáně podél osy. Odsuňte měchýř anteriorně směrem k semenným váčkům (SV), čímž se odkryje levý a pravý lalok ventrální prostaty (pokryté vrstvou tuku). Opatrně očistěte pravý a levý lalok VP od tuku. Jemně oddalte pravý lalok VP od močové trubice a odřízněte lalok od močové trubice. Zatímco stále držíte pravý lalok VP, jemně oddalte levý lalok VP od močové trubice a poté odřízněte; zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.
 - Při sekci SVCG odsuňte močový měchýř kaudálním směrem, čímž se odkryje chámovod a pravé a levé lalůčky semenných váčků spolu s koagulačními žlázami (SVCG). Zabraňte úniku tekutiny nasazením hemostatu v basi SVCG, kde se chámovod napojuje na močovou trubici. SVCG opatrně odřízněte, s nasazeným hemostatem stále na místě odstraňte tuk a připojené orgány, vložte do tárované misky vah, sejměte hemostat, zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

- Při sekci svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus (LABC) se odkryjí svaly a kořen penisu. Svaly LA obtáčí tračník a svaly LA anterior a BC jsou připojeny k bulbu penisu. Odstraní se kůže a připojené orgány z perianální oblasti, která se táhne od kořene penisu až po anteriorní konec konečníku. Od bulbu a tkání penisu se postupně odříznou svaly BC. Tračník se rozřízne na dvě části a lze odříznout a oddělit celé LABC. LABC se zbaví tuku a připojených orgánů, zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnost se zaznamená.
 - Po odstranění LABC jsou vidět zaoblené Cowperovy nebo též bulbouretrální žlázy (COW) při basi bulbu penisu, poněkud dorzálně. Je nutný opatrný řez, aby nedošlo k proříznutí tenkého váčku a zamezilo se úniku tekutiny. Zvažte párové COW s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.
 - Dojde-li během pitvy a sekce ke ztrátě tekutiny z kterékoli žlázy, je třeba to zaznamenat.
55. Jestliže hodnocení každé chemické látky vyžaduje pitvu většího počtu zvířat, než kolik se dá stihnout za jeden den, může být začátek studie rozložen do dvou po sobě jdoucích dnů, což vede k rozložení pitvy a související práce na dva dny. Pokud k takovému rozložení dojde, měla by být každý den použita polovina zvířat z každé experimentální skupiny.
56. Zbývající části mrtvých těl se po pitvě vhodným způsobem zlikvidují.

PŘEKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

57. Měly by být uvedeny údaje o jednotlivých zvířatech (tj. tělesná hmotnost, hmotnost přídatných pohlavních tkání, volitelná měření a další reakce a pozorování) a za každou skupinu zvířat (střední hodnoty a směrodatné odchylky všech uskutečněných měření). Údaje by se měly shrnout do tabulky. Údaje by měly uvádět počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která byla během zkoušky nalezena uhynulá nebo která vykazovala znaky toxicity, a popis pozorovaných znaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti.
58. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkušební zařízení:

- název a místo zařízení,
- vedoucí studie a ostatní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,
- datum zahájení a datum ukončení studie, tj. první den podávání zkoušené chemické látky a poslední den pitvy.

Zkoušená chemická látka:

- původ, číslo šarže/sady, identifikace, čistota, plná adresa dodavatele a charakterizace zkoušené chemické látky (látek),
- fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- podmínky skladování a metoda a frekvence přípravy roztoku,
- veškeré získané údaje o stálosti,
- veškeré analýzy dávkování roztoků/suspenzí.

Vehikulum:

- charakterizace vehikula (identifikace, dodavatel a číslo šarže),
- zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata a postupy chovu zvířat:

- druh/kmen a zdůvodnění jejich výběru,
- zdroj nebo dodavatel zvířat, včetně plné adresy,
- počet a stáří dodaných zvířat,

- podmínky chovu (teplota, osvětlení apod.),
- strava (název, typ, dodavatel, číslo šarže, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),
- stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),
- podmínky chovu v kleci a počet zvířat v jedné kleci.

Podmínky zkoušky:

- věk při kastraci a trvání aklimatizace po kastraci,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku studie (s přesností na 0,1 g),
- proces náhodného výběru a záznam o přidělení do skupiny s vehikulem, do referenční skupiny, do skupiny, které se podává zkoušená chemická látka, a do klecí,
- střední hodnota a směrodatná odchylka tělesných hmotností u každé skupiny za každý den vážení po celou dobu studie,
- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,
- v případě zkoušky na antiandrogenitu, expozice TP (dávka a objem),
- expozice zkoušené chemické látky (dávka a objem),
- doba podávání dávek,
- pitevní postupy, včetně způsobů vykrvení a veškeré anestezie,
- pokud jsou prováděny analýzy séra, měly by být uvedeny podrobnosti o metodě. Je-li například použita metoda radioimunologické analýzy (RIA), měl by být uveden postup RIA, zdroj souprav RIA, datum použitelnosti souprav, postup scintilační spektrometrie a standardizace.

Výsledky:

- každodenní pozorování každého zvířete během podávání dávky, včetně:
- tělesné hmotnosti (s přesností na 0,1 g),
- klinických příznaků (existují-li),
- veškerých měření spotřeby potravy nebo poznámek k ní,
- pozorování při pitvě každého zvířete, včetně:
- data pitvy,
- experimentální skupiny zvířat,
- identifikačního čísla,
- jména pracovníka provádějícího pitvu,
- denní doby, kdy byla provedena pitva a sekce,
- věku zvířete,
- konečné tělesné hmotnosti při pitvě, s uvedením veškerých statisticky významných zvýšených nebo snížených hodnot,
- pořadí vykrvácení zvířete a sekci při pitvě,
- hmotnosti pěti cílových tkání závislých na androgenech:
- ventrální prostata (s přesností na 0,1 mg),
- semenné vajíčky spolu s koagulačními žlázami, včetně tekutiny (páru, s přesností na 0,1 mg),
- svalový komplex m. levator ani spolu s m. bulbocavernosus (s přesností na 0,1 mg),
- Cowperovy žlázy (čerstvá hmotnost – párové, s přesností na 0,1 mg),
- žalud penisu (čerstvá hmotnost, s přesností na 0,1 mg),

- hmotnosti tkání měřených fakultativně, provádějí-li se:
- játra (s přesností na 0,1 g),
- ledviny (pár, s přesností na 0,1 mg),
- nadledvinky (pár, s přesností na 0,1 mg),
- obecné poznámky a komentáře.
- analýzy hormonů v séru, provádějí-li se
 - sérový LH (fakultativní – ng na 1 ml séra) a
 - sérový T (fakultativní – ng na 1 ml séra)
- obecné poznámky a komentáře.

Shrnutí údajů

Údaje by měly být shrnuty v tabulce obsahující velikost vzorku u každé skupiny, střední hodnotu a standardní odchylku od střední hodnoty nebo směrodatnou odchylku. Tabulky by měly obsahovat tělesné hmotnosti při pitvě, změny tělesné hmotnosti od zahájení podávání dávek až do pitvy, hmotnosti cílových přídatných pohlavních tkání a veškeré hmotnosti orgánů měřené dobrovolně.

Diskuse výsledků

Analýza výsledků

59. Tělesné hmotnosti a hmotnosti orgánů při pitvě se statisticky analyzují za účelem zjištění takových charakteristik, jako je homogenita rozptylu s vhodnou transformací údajů podle potřeby. Experimentální skupiny by měly být porovnány s kontrolní skupinou pomocí technik jako je ANOVA s následnými párovými srovnáními (např. Dunnettův jednostranný test) a porovnáním s kritériem pro hodnocení statistických rozdílů, např. $p \leq 0,05$. Měly by být určeny ty skupiny, které dosahují statistické významnosti. 'Relativní hmotnost orgánů' by však neměla být použita vzhledem k neplatným statistickým předpokladům pro tuto manipulaci s daty.
60. V případě androgenního agonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáváno pouze vehikulum. Charakteristiky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání, například trenbolon, který nemůže být redukován 5-alfa-reduktázou, má výraznější účinky na LABC a GP, než jsou účinky TP. Statisticky významné zvýšení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního agonismu a určitý stupeň zvýšení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.
61. V případě androgenního antagonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáván pouze referenční androgen (testosteron propionát). Typické znaky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání; například inhibitory 5-alfa-reduktázy, jako finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně ve srovnání s účinnými antagonisty androgenních receptorů, jako je flutamid. Statisticky významné snížení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) související s aplikací pouze TP by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního antagonismu a určitý stupeň snížení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.
62. Údaje by měly být shrnuty v tabulce obsahující střední hodnotu (průměr), střední chybu průměru (SE) (přijatelná by byla i směrodatná odchylka – SD) a velikost vzorku v každé skupině. Přiloženy by měly být také tabulky s údaji o jednotlivých zvířatech. Individuální hodnoty, střední hodnota, SE (SD) a variační koeficient (CV) pro zvířata kontrolní skupiny by měly být posouzeny, zda splňují stanovená kritéria shody s historickými hodnotami. Variační koeficienty, které převyšují hodnoty CV pro hmotnost každého orgánu uvedené v tabulce 1 (viz odstavce 25 a 26), ukazují, že mohlo dojít k chybě při zaznamenávání nebo vkládání údajů nebo že laboratoř dosud nevládla přesnou pitvu tkání závislých na androgenech a je nutný další výcvik/praxe. Obecně platí, že variační

koeficienty ($CV = \text{směrodatná odchylka} / \text{střední hodnota}$ hmotnosti orgánu) jsou reprodukovatelné v různých laboratořích a v různých studiích. Předkládané údaje by měly zahrnovat přinejmenším údaje o hmotnostech ventrální prostaty, semenných váčků, svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperových žláz, žludu penisu, jater a o tělesné hmotnosti a změně tělesné hmotnosti od začátku podávání dávek až do pitvy. Předloženy mohou být také údaje po kovariační úpravě tělesné hmotnosti, ale to by nemělo nahradit předložení neupravených údajů. Dále, nedojde-li v žádné ze skupin k odpojení předkožky, výskyt odpojení předkožky by měl být zaznamenán a mělo by být provedeno jeho statistické srovnání s kontrolní skupinou pomocí *Fisher Exact* testu.

63. Při ověřování správnosti údajů vložených do počítače porovnáním s původními záznamy by hodnoty hmotností orgánů, které nejsou biologicky reálné nebo se od středních hodnot této experimentální skupiny liší více než o trojnásobek směrodatné odchylky, měly být pečlivě zkontrolovány a možná budou muset být vyloučeny, neboť se pravděpodobně jedná o chyby v záznamu.
64. Porovnání výsledků studie s hodnotami variačních koeficientů OECD (v tabulce 1) je často důležitým krokem při interpretaci validity výsledků studie. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční chemické látky, jako je testosteron propionát a flutamid. Laboratoře mohou rovněž periodicky testovat reakci na známé slabé agonisty a antagonisty androgenů a tyto údaje uchovávat. Tyto údaje mohou být porovnávány s dostupnými údaji OECD, aby se zajistilo, že metody používané laboratoří mají dostatečnou statistickou přesnost a sílu.

Dodatek 1

DEFINICE

Androgenní je výraz, který se používá k popisu kladného vlivu na růst tkání závislých na androgenech.

Antiandrogenní je schopnost chemické látky potlačit působení TP u savců.

Citlivostí se rozumí schopnost zkušební metody správně identifikovat chemické látky, které mají vlastnost, jež je testována.

Datem narození se rozumí postnatální den 0.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. V případě Hershbergerovy biologické zkoušky je dávka vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti pokusného zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den).

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

Moribundní stav (agónie) je výraz, který se používá k popisu umírajícího zvířete, tj. těsně před smrtí.

Specifičností se rozumí schopnost zkušební metody správně identifikovat chemické látky, které nemají vlastnost, jež je testována.

Validací se rozumí vědecký proces, který má charakterizovat operační požadavky a omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a vhodnost pro konkrétní účel.

X-tým postnatálním dnem se rozumí x-tý den života po dni narození.

Zkoušenou chemickou látkou se rozumí jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebních pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedání pracovní skupiny EDTA

OECD Koncepční rámec pro zkoušky a hodnocení endokrinních disruptorů

Úroveň 1 Trídění a prioritizace na základě stávajících informací	— Fyzikální a chemické vlastnosti, např. MW, reaktivita, volatilita, biologická rozložitelnost, — Expozice lidí a životního prostředí, např. Objem výroby, uvolňování, vzorce užívání — Nebezpečí, např. dostupné toxikologické údaje
Úroveň 2 Zkoušky <i>in vitro</i> poskytují mechanistické	— Afinita vázání receptoru ER, AR, TR — Transkripční aktivace — Aromatáza a steroidogeneze <i>in vitro</i> — Vázání/rozpoznání receptoru aryluhlovodiků — QSAR — Vysoce výkonné předběžné screeniny — Funkce štítné žlázy — VTG zkouška rybích hepatocytů — Jiné (dle možnosti)
Úroveň 3 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o jednotlivých endokrinních mechanismech a účincích	— Uterotrofiní zkouška (estrogenová souvislost) — Hershbergerova zkouška (androgenní souvislost) — Nereceptorová zprostředkovaná funkce hormonu — Jiné (např. Štítná žláza) — Zkouška rybiho VTG (vitellogenin) (estrogenová souvislost)
Úroveň 4 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o mnohočetných endokrinních mechanismech a účincích	— Vylepšený pokyn OECD 407 (cílové parametry na základě endokrinních mechanismů) — Zkoušky období dospívání samců a samic — Zkoušky intaktních dospělých samců — Zkouška histopatologie pohlavních žláz ryb — Zkouška metamorfozy žab
Úroveň 5 Zkoušky <i>in vivo</i> poskytující údaje o účincích endokrinních a jiných mechanismů	— Jednogeneční zkouška (TG415, vylepšená)¹ — Dvougeneční zkouška (TG416 vylepšená)¹ — Reprodukční screeningový (TG421 vylepšený)¹ — kombinovaný 28 denní/reprodukční screeningový test (TG 422 vylepšený)¹ ¹ Případná vylepšení budou zvažována v rámci VMG mamm — Zkoušky částečného a celého životního cyklu u ryb, ptáků, obojživelníků a bezobratlých (vývojové a reprodukce)

VMG mamm: Skupina pro řízení validace zkoušek na savcích

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

- Poznámka 1:** Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.
- Poznámka 2:** Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.
- Poznámka 3:** Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.
- Poznámka 4:** Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.
- Poznámka 5:** Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímne. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.
- Poznámka 6:** U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

LITERATURA

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. března 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- 3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- 4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- 5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- 6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- 7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265–1269.
- 8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671–8.
- 9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J* 26:413–422.
- 10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306–1314.
- 11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38–44.
- 12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113–119.
- 13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.

- 14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- 15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York: Academic Press, 151–220.
- 16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, s. 38.
- 17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- 19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- 22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- 23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- 24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- 25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- 26) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33.
- 27) Následující kapitoly v této příloze:
 - B.1a, akutní orální toxicita – metoda fixní dávky
 - B.1b, akutní orální toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity

B.56 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ STUDIE TOXICITY PRO REPRODUKCI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 443 (2012). Vychází z návrhu Institutu pro vědy o živé přírodě (ILSI), Institutu pro zdravotní a environmentální vědy (HESI) a Technického výboru pro posuzování zemědělsko-chemické bezpečnosti (ACSA), týkajícího se rozšířené jednogenerační studie reprodukce v F_1 generaci publikovaném v dokumentu Cooper et al., 2006 (1). Struktura studie zaznamenala několik vylepšení a vyjasnění s cílem zajistit flexibilitu a zdůraznit, že je důležité začít se stávajícími poznatky, a současně používat průběžná pozorování v životním cyklu k organizaci a modifikaci provádění zkoušek. Tato zkušební metoda poskytuje podrobný popis rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Zkušební metoda popisuje tři kohorty zvířat F_1 generace:
 - kohorta 1: posuzuje reprodukční/vývojové ukazatele; tuto kohortu lze rozšířit o F_2 generaci.
 - kohorta 2: posuzuje případný dopad expozice chemické látky na vyvíjející se nervovou soustavu.
 - kohorta 3: posuzuje případný dopad expozice chemické látky na vyvíjející se imunitní systém.

2. Rozhodnutí o tom, zda hodnotit druhou generaci a vypustit kohortu vývojové neurotoxicity a/nebo kohortu vývojové imunotoxicity, by se měla opírat o stávající poznatky o hodnocené chemické látce, stejně jako o potřeby různých regulačních orgánů. Účelem této zkušební metody je poskytnout podrobné údaje o tom, jak lze studii provádět a jak vyřešit způsob hodnocení jednotlivých kohort.
3. Pro regulační orgány, které pro rozhodování o povinném zařazení druhé generace do postupu testování používají tzv. vnitřních příkazů, byl pro tyto účely vydán pokyn OECD č. 117 (39).

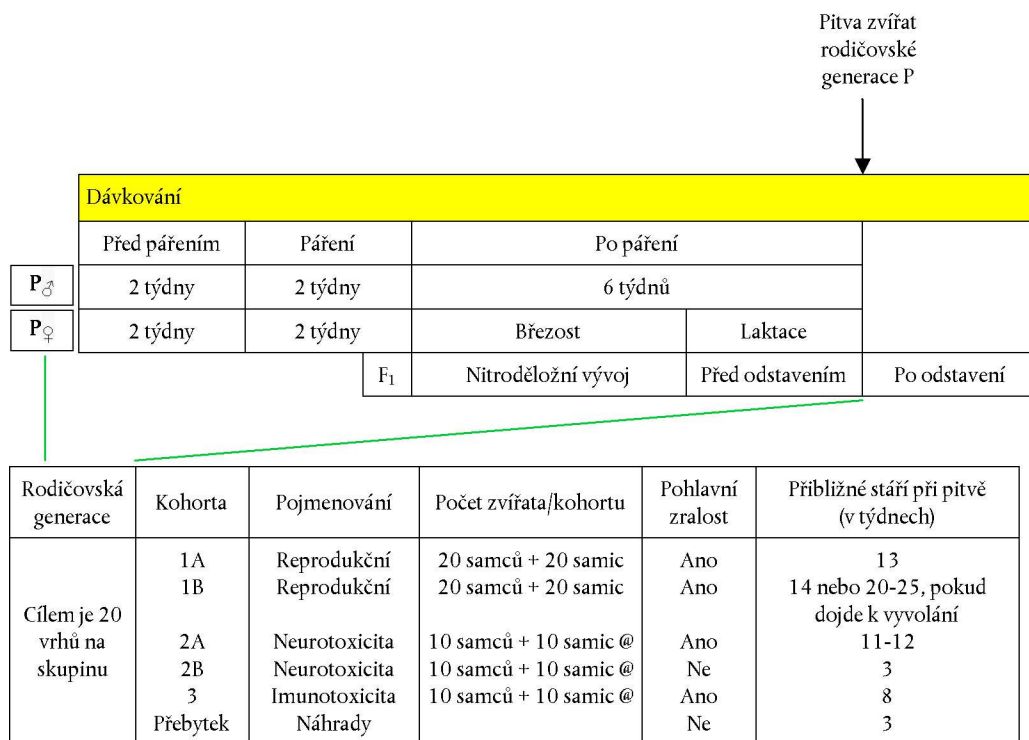
VÝCHOZÍ ÚVAHY A CÍLE

4. Hlavním cílem rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci je zhodnotit konkrétní životní stadia, která nejsou zahrnuta do jiných typů studií toxicity, a otestovat účinky, které se mohou vyskytnout v důsledku expozice chemické látky v prenatalním a postnatalním stadiu. V případě reprodukčních ukazatelů se předpokládá, že pokud jsou takové údaje dostupné, tak jako první krok jsou pro odhalení účinků na reprodukční orgány samců a samic použity informace ze studií opakovaného dávkování, např. OECD TG 422 (32), nebo krátkodobých screeningových zkoušek endokrinních disruptorů, (např. Uterotrofní zkouška – zkušební metoda B.54 (36) a Hershbergerova zkouška – zkušební metoda B.55 (37)). To může zahrnovat údaje o spermatogenezi (histopatologické vyšetření varlat) u samců a estrální cyklus, počty folikulů/zrání oocytů a integrita vaječníků (histopatologické vyšetření) u samic. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poté slouží jako zkouška reprodukčních ukazatelů, které vyžadují interakci samců se samicemi, samic se zárodkem a samic s potomstvem a F₁ generací až do doby po dosažení pohlavní zralosti (viz pokyn OECD č. 151 podporující tuto zkušební metodu (40)).
5. Tato zkušební metoda má poskytnout hodnocení prenatalních a postnatalních účinků chemických látek na vývoj, jakož i důkladné zhodnocení systémové toxicity u březích samic a samic v době laktace a u mladého a dospělého potomstva. Očekává se, že při podrobném zkoumání klíčových vývojových ukazatelů, jakými jsou životaschopnost potomstva, neonatální zdraví, vývojový stav při narození a fyzický a funkční vývoj do dospělosti, budou určeny konkrétní cílové orgány v potomstvu. Studie navíc poskytne a/nebo potvrdí informace o účincích zkoušené chemické látky na integritu a výkonnost rozmnožovací soustavy dospělých samců a samic. V úvahu jsou brány konkrétně, nikoli však výlučně tyto parametry: funkce pohlavních žláz, estrální cyklus, zrání epididymálních spermií, způsob chování při páření, plození, březost, vrh a laktace. Dále budou informace získané z posouzení vývojové neurotoxicity a vývojové imunotoxicity charakterizovat potenciální účinky v těchto systémech. Údaje odvozené z těchto zkoušek by měly umožnit určení dávek bez pozorovaného nepříznivého účinku (*No-Observed Adverse Effect Levels* – NOAEL), dávek s nejnižším pozorovaným nepříznivým účinkem (*Lowest Observed Adverse Effect Levels* – LOAEL) a/nebo referenčních dávek pro různé ukazatele a/nebo by měly být využity k charakterizaci účinků zjištěných v předchozích studiích s opakovaným dávkováním a/nebo by měly sloužit jako návod pro následné zkoušky.
6. Schéma zkušebního postupu obsahuje obrázek 1. Zkoušená chemická látka je podávána nepřetržitě ve stupňovaných dávkách několika skupinám pohlavně zralých samců a samic. Této rodičovské generaci (P) jsou dávky podávány po stanovené období před pářením (vybráno na základě dostupných informací pro zkoušenou chemickou látku, ale minimálně po dobu dvou týdnů) a po dvoutýdenní období páření. Samcům z P generace jsou dávky podávány dále nejméně až do odstavení generace F₁. Dávky by měly dostávat minimálně 10 týdnů. Je-li nutné objasnit účinky na reprodukci, mohou dávky dostávat déle. Podávání dávek samicím P generace pokračuje během březosti a laktace až do utracení po odstavení jejich vrhu (tj. 8–10 týdnů aplikace). Potomstvo z generace F₁ dostává další dávky zkoušené chemické látky od odstavení až do dospělosti. Pokud je hodnocena druhá generace (viz pokyn OECD č. 117 (39)), potomci z generace F₁ budou dávky dostávat až do odstavení generace F₂ nebo až do ukončení studie.
7. U všech zvířat se provádějí klinická pozorování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na zdraví, růst, vývoj a funkci jejich potomstva. Při odstavení jsou vybraní potomci zařazeni do konkrétních podskupin (kohorty č. 1–3, viz odstavce 33 a 34 a obrázek 1), kde jsou dále zkoumány, včetně pohlavní zralosti, integrity a funkce reprodukčních orgánů, ukazatelů v oblasti neurologie a chování a funkcí imunity.
8. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických znaků jako humánních ukazatelů pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (34).

9. Až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude zkušební metoda přezkoumána a v případě potřeby bude tato zkušební metoda revidována z hlediska nabytých zkušeností.

Obrázek 1

Schéma rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci



@ Pokud možno jeden na vrh a celkově je třeba reprezentovat všech 20 vrhů, pokud je to možné

POPIS METODY/PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU

Zvířata

Výběr živočišných druhů a kmenů

10. Výběr druhů pro zkoušku toxicity pro reprodukci by měl být pečlivě zvážen z hlediska veškerých dostupných informací. Avšak vzhledem k rozsahu existujících základních údajů a vzhledem ke srovnatelnosti s výsledky obecných zkoušek toxicity je obvykle upřednostňovaným druhem potkan a právě na tento druh odkazují kritéria a doporučení uvedená v této zkušební metodě. Pokud je použit jiný živočišný druh, měl by být jeho výběr odůvodněn a bude nutné patřičným způsobem upravit zkušební postup. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem spontánních vývojových vad.

Kritéria pro stáří, tělesnou hmotnost a zařazení do skupin

11. Měla by být použita zdravá rodičovská zvířata, která nebyla předtím podrobena žádným pokusům. Měli by být zkoumány samci i samice, samice by měly být nulipary a neměly by být březí. Zvířata z P generace by měla být pohlavně zralá, měla by mít v době zahájení podávání dávek podobnou hmotnost (v rámci pohlaví), měla by být podobně stará (přibližně 90 dní) při páření a měla by být reprezentativní v rámci zkoumaného druhu a kmene. Zvířata by se měla po dobu nejméně pěti dnů po přejímce aklimatizovat. Zvířata jsou náhodně rozřazena do kontrolních skupin a experimentálních skupin tak, že výsledkem jsou srovnatelné střední hodnoty tělesné hmotnosti (tj. ± 20 % střední hodnoty).

Podmínky chovu a krmení

12. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C ($\pm 3^\circ$). Relativní vlhkost by se měla pohybovat mezi 30 a 70 %, přičemž ideální je rozmezí od 50 do 60 %. Umělé osvětlení by mělo svítit 12 hodin a 12 hodin by

měla být tma. Může být použita konvenční laboratorní potrava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Zvláštní pozornost by se měla věnovat obsahu fytoestrogenů ve stravě, jelikož vysoká míra fytoestrogenů ve stravě by mohla ovlivnit některé reprodukční ukazatele. Je doporučena standardizovaná strava s nestanoveným složením, v níž byly omezeny látky obsahující estrogény (2) (30). Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Měl by být ověřen obsah, homogenita a stabilita zkoušené chemické látky v potravě. Měla by být pravidelně prováděna analýza krmiva a pitné vody z hlediska příměsí. Vzorky každé šarže potravy používané během studie by měly být až do dokončení zprávy uchovávány za vhodných podmínek (např. zmrazené při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pro případ, že bude nutné provést další analýzu složek potravy.

13. Zvířata by měla být umístěna do klecí v malých skupinách obsahujících zvířata stejného pohlaví a experimentální skupiny. Zvířata lze chovat jednotlivě, aby se předešlo případným zraněním (např. samci po období páření). Páření by mělo probíhat ve vhodných klecích. Po páření je třeba umístit samice, u nichž se předpokládá, že byly oplodněny, odděleně do porodních nebo mateřských klecí, kde jim je poskytnut odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda. Mláďata jsou až do odstavení se svými matkami. Zvířata F_1 generace by měla být umístěna v malých skupinách téhož pohlaví a experimentální skupiny od odstavení až do utracení. Je-li to vědecky odůvodněno, mohou být zvířata umístěna samostatně. Obsah fytoestrogenů obsažených ve vybraném materiálu pro podestýlku by měla být minimální.

Počet a identifikace zvířat

14. Každá zkušební a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet spárených párů, aby mohlo být dosaženo alespoň dvaceti březích samic v jedné dávkové skupině. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti dané chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samic generace P, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí až do dospělosti. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat, nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu s uvážením možného příčinného vztahu ke zkoušené chemické látce.
15. Každému zvířeti P generace se před podáváním dávek přiřadí vlastní identifikační číslo. Naznačují-li laboratorní historické údaje, že významná část samic nemusí vykazovat pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus, je doporučeno provést před aplikací posouzení estrálního cyklu. Případně lze velikost skupiny zvýšit, aby bylo zajištěno, že alespoň dvacet samic v každé skupině bude mít při zahájení aplikace pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus. Veškeré potomstvo z F_1 generace dostane vlastní identifikaci při první prohlídce novorozenečných mláďat v postnatální den (PND) 0 nebo 1. Záznamy označující vrh, z kterého pochází, by měly být uchovávány pro všechna zvířata F_1 generace, příp. zvířata F_2 generace po celou dobu studie.

Zkoušená chemická látka

Dostupné informace o zkoušené chemické látce

16. Průzkum existujících informací je důležitý pro rozhodnutí o způsobu podání, výběru vehikula, volbě živočišných druhů, volbě dávkování a potenciálních modifikacích dávkovacího programu. Z tohoto důvodu by při plánování rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci měly být vzaty v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, tj. fyzikálně-chemické vlastnosti, toxikokinetika (včetně metabolismu specifického pro daný druh), toxikodynamické vlastnosti, vztahy mezi strukturou a aktivitou (SAR), metabolické procesy *in vitro*, výsledky předchozích studií toxicity a příslušné informace pro strukturní analogy dané látky. Předběžné informace o absorpci, distribuci, metabolismu a eliminaci (ADME) a bioakumulaci lze odvodit z chemické struktury, fyzikálně-chemických údajů, míry vázání plazmatických bílkovin nebo toxikokinetických (TK) studií, zatímco doplňující informace jsou získávány z výsledků studií o toxicitě, např. o NOAEL, metabolismu nebo indukci metabolismu.

Zohlednění toxikokinetických údajů

17. Ačkoli to není vyžadováno, toxikokinetické údaje z dříve provedených předběžných studií pro stanovení rozmezí dávek nebo jiných studií jsou mimořádně užitečné při plánování struktury studie, volbě úrovní dávek a interpretaci výsledků. Užitečné jsou zejména ty údaje, které: 1) ověřují expozici vyvíjejících se plodů a mláďat zkoušené chemické látky (nebo příslušným metabolitům), 2) poskytují odhad interní dozimetrie, a 3) hodnotí potenciální

saturaci kinetických procesů v závislosti na dávkách. Jsou-li k dispozici, měly by být zohledněny i další toxikokinetické údaje, jako jsou profily metabolitů, vývoj koncentrace v čase atd. Během hlavní studie lze shromáždit i doplňující toxikokinetické údaje za předpokladu, že tento sběr nezasahuje do sběru a interpretace ukazatelů hlavní studie.

Obecně při plánování rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci je užitečné zařadit následující soubory toxikokinetických údajů:

- pozdní březost (např. den gestace 20) – krev matky a krev plodu,
- střední laktace (PND 10) – krev matky, krev mláďete a/nebo mléko,
- brzké odstavení (např. PND 28) – krevní vzorky odstaveného mláďete.

Při určování specifických analytů (např. chemická látka a/nebo metabolity u rodičů) a schématu odběru vzorků je zapotřebí postupovat flexibilně. Například počet a načasování sběru vzorků v daný den odběru vzorků bude záviset na způsobu expozice a předchozích znalostech toxikokinetických vlastností u zvířat, která nejsou březí. U studií potravy stačí odběr vzorků v jeden pevný čas v každý z těchto dnů, zatímco podávání dávek žaludeční sondou může vyžadovat další časy odběru vzorků pro získání lepšího odhadu rozmezí interních dávek. Není však nutné generovat v kterýkoli z dnů odběru vzorků úplný vývoj koncentrace v čase. V nezbytném případě může být krev pro fetální a neonatální analýzu smíchána podle pohlaví v rámci vrhů.

Způsob podání

18. Při volbě způsobu podání by měl být zohledněn způsob, případně způsoby, které jsou nejdůležitější z hlediska expozice člověka. Ačkoli zkušební postup je popsán pro podávání zkoušené chemické látky ve stravě, může být upraven pro podávání jinými způsoby (pitnou vodou, žaludeční sondou, inhalací, kůží) v závislosti na vlastnostech dané chemické látky a požadovaných informacích.

Volba vehikula

19. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Je doporučeno, je-li to možné, nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/suspense v oleji (např. kukuřičném oleji). U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Neměla by být používána vehikula s vlastní toxicitou (např. aceton, DMSO). Měla by být určena stabilita zkoušené chemické látky v daném vehikulu. Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiné aditivum, měla by být věnována pozornost jeho následujícím charakteristikám: účinkům na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinkům na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinkům na spotřebu potravy nebo vody nebo nutriční stav zvířat.

Výběr dávek

20. Studie by zpravidla měla obsahovat nejméně tři úrovně dávek a souběžnou kontrolu. Při výběru vhodných úrovní dávek by experimentátor měl zvážit všechny dostupné informace, včetně informací o dávkování z předchozích studií, toxikokinetických údajů získaných z březích nebo nebřezích zvířat, rozsahu laktálního transferu a odhadů expozice člověka. Jsou-li k dispozici toxikokinetické údaje, které uvádějí saturaci toxikokinetických procesů v závislosti na dávkách, je zapotřebí se vyvarovat vysokých úrovní dávek, které jasně ukazují saturaci, ovšem za předpokladu, že se očekává, že expozice lidí budou výrazně nižší než bod saturace. V takových případech by nejvyšší úroveň dávek měla být na úrovni inflexního bodu pro přechod na nelineární toxikokinetické chování nebo jen mírně nad ním.
21. Nejsou-li k dispozici příslušné toxikokinetické údaje, úrovně dávek by měly vycházet z toxických účinků, nejsou-li omezeny fyzikální/chemickou povahou zkoušené chemické látky. Pokud se úrovně dávek opírají o toxicitu, nejvyšší dávka by měla být vybrána s cílem vyvolat určitou systémovou toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení zvířat.
22. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a stanovit hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo dávky blízko limitu detekce, které by umožnily odvození referenční dávky pro nejcitlivější ukazatel(e). S cílem předejít velkým rozmezím dávek mezi NOAEL a LOAEL jsou často optimální dvojnásobné až čtyřnásobné intervaly. Často je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velký interval (např. odpovídající faktorů většímu než 10) mezi dávkami.

23. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Této skupině se nepodává žádná látka nebo tvoří kontrolní skupinu s napodobeným podáváním nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené chemické látky vehikulum používá. Používá-li se vehikulum, mělo by se kontrolní skupině podat v nejvyšším používaném objemu.

Limitní zkouška

24. Pokud není prokázána toxicita u dávky nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den ve studiích s opakovaným dávkováním nebo pokud se toxicita neočekává ani na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných chemických látkách, naznačujících podobnost metabolických vlastností *in vivo/in vitro*, pak studie s několika dávkami nemusí být nutná. V takových případech rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci může být provedena s kontrolní skupinou s jednou dávkou o velikosti nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den. Pokud však bude toxicita pro reprodukci nebo vývoj v této limitní dávce nalezena, budou pro identifikaci NOAEL požadovány další studie při nižších úrovních dávek. Tyto úvahy o limitní zkoušce se uplatňují pouze tehdy, když expozice člověka nenaznačuje nutnost vyšší úrovně dávky.

POSTUPY

Expozice potomstva

25. Upřednostňovaným způsobem podání je expozice v potravě. Pokud se provádějí studie s podáváním látky žaludeční sondou, je zapotřebí poznamenat, že mláďata budou dostávat zkoušenou chemickou látku pouze nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích s podáváním látky v potravě nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou chemickou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktčního období sama žrát. Pokud je vylučování zkoušené chemické látky v mléce špatné a pokud je nedostatek dokladů o nepřetržité expozici potomstva, měly by být zváženy modifikace uspořádání studie. V těchto případech by mělo být zváženo na základě dostupných toxikokinetických informací, toxicity u potomstva nebo změnách biomarkerů (3) (4) přímé podávání dávek mláďatům v laktčním období. Před provedením studií přímého podávání dávek kojeným mláďatům (5) by měly být pečlivě zváženy přínosy a nevýhody.

Plán dávkování a podávání dávek

26. Z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování, které měly adekvátní trvání, mohou být k dispozici určité informace o estrálních cyklech, histopatologických vyšetřeních samčího a samičího pohlavního ústrojí a analýze varlat/epididymálních spermií. Délka expozice před pářením v rámci rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci se tudíž zaměřuje na odhalení účinků na funkční změny, které mohou zasáhnout do způsobu chování při páření a do oplodnění. Expozice před pářením by měla být dostatečně dlouhá kvůli tomu, aby bylo dosaženo stálých podmínek expozice u samců i samic P generace. Ve většině případů se za adekvátní pro obě pohlaví považuje dvoutýdenní expozice před pářením. U samic zahrnuje tři až čtyři celé estrální cykly a měla by stačit k odhalení jakýchkoli negativních účinků na cykly. U samců toto trvání odpovídá době požadované pro epididymální přechod zrajících spermií a mělo by umožnit odhalení posttestikulárních účinků na spermie při páření (během konečných stadií spermiace a epididymálního zrání spermií). V době utracení, kdy je naplánováno histopatologické vyšetření varlat a nadvarlat a analýza parametrů spermií, budou samci P a F₁ generace mít za sebou expozici pro nejméně jeden celý spermatogenní proces ((6) (7) (8) (9) a pokyn OECD č. 151 (40)).
27. Scénáře expozice samců před pářením lze přizpůsobit, pokud v předchozích studiích byla jasně identifikována toxicita pro varlata (zhoršení spermatogeneze) nebo účinky na integritu a funkci spermatu. Podobně i u samic mohou známe účinky zkoušené chemické látky na estrální cyklus, a tudíž i pohlavní citlivost odůvodnit různé scénáře expozice před pářením. Ve zvláštních případech lze akceptovat, aby aplikace u samic P generace byla zahájena až po získání stěru pozitivního na spermie (viz pokyn OECD č. 151 (40)).
28. Po stanovení období podávání dávek před pářením by měla být zvířatům zkoušená chemická látka podávána nepřetržitě po dobu sedmi dnů v týdnu až do pitvy. Všem zvířatům by měly být dávky podávány stejným způsobem. Podávání dávek by mělo pokračovat během dvoutýdenního páření a u samic P generace po dobu gestace a laktace až do jejich utracení po odstavení mláďat. U samců by aplikace měla probíhat stejným způsobem až do utracení v době, kdy jsou zvířata F₁ generace odstavena. U pitvy by přednost měla být dána samicím, které by měly být pitvány ve stejném/přibližně stejném dni laktace. Pitvu samců lze v závislosti na laboratorních

možnostech rozložit na dobu většího počtu dnů. Nebylo-li přímé podávání dávek vybraným samcům a samicím F_1 generace zahájeno již během období laktace, mělo by začít při odstavení a mělo by pokračovat až do naplánované pitvy v závislosti na zařazení do kohorty.

29. U chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v potravě, lze uplatňovat buď konstantní koncentraci v potravě (ppm) nebo konstantní úroveň dávek z hlediska tělesné hmotnosti zvířete; vybraná možnost by měla být specifikována.
30. Při podávání zkoušené chemické látky žaludeční sondou by objem jednorázově podané kapaliny neměl zpravidla překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti je maximum pro olej, např. kukuřičný olej). S výjimkou dráždivých nebo žíravých chemických látek, kde se ve vyšších koncentracích obvykle ukáže další zhoršení účinků, se proměnlivost množství zkoušené látky sníží nastavením takové koncentrace, která zajistí konstantní množství na všech úrovních dávek. Aplikace by měla být prováděna každý den zhruba ve stejnou dobu. Dávka pro každé zvíře by měla zpravidla vycházet z posledního individuálního určení tělesné hmotnosti a měla by být upravována nejméně jednou týdně u dospělých samců a dospělých nebřezích samic a jednou za dva dny u březích samic a zvířat F_1 generace, pokud je podávána před odstavením a v průběhu dvou týdnů po odstavení. Naznačují-li toxikokinetické údaje nízký placentární přenos zkoušené chemické látky, může být nutné podávání žaludeční sondou v posledním týdnu březosti upravit tak, aby březí samice nebyla podána příliš toxická dávka. Samicím by chemická látka v den vrhu neměla být podávána žaludeční sondou ani žádným jiným způsobem, při kterém se se zvířaty musí manipulovat; v tento den se upřednostňuje zkoušenou chemickou látku nepodávat a nerušit proces porodu.

Páření

31. Každá samice P generace by měla být umístěna s jedním, náhodně vybraným, nepříbuzným samcem z téže dávkové skupiny (páření 1:1) až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Pokud je nedostatek samců, například z důvodu jejich uhynutí před pářením, lze samce, který/kteří se již spáril/i, pářit (1:1) s druhou samicí, aby byly spářeny všechny samice. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). Zvířata by měla být oddělena co nejdříve po pozorování důkazů o spáření. Nedošlo-li ke spáření do dvou týdnů, zvířata by měla být oddělena bez další možnosti páření. Spářené páry se v záznamech jasně označí.

Velikost vrhu

32. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu pěti samců a pěti samic z jednoho vrhu. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti, není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice).

Výběr mláďat pro studie po odstavení (viz obrázek 1)

33. Pro další zkoumání je při odstavení (kolem PND 21) mláďat ze všech dostupných vrhů vybráno až do 20 jedinců na jednu dávkovou skupinu a také kontrolní skupina a tento stav je udržován až do pohlavní zralosti (pokud nejsou vyžadovány dřívější zkoušky). Jedinci jsou vybíráni náhodně s tou výjimkou, že by neměla být do těchto skupin zařazována zakrslá mláďata (zvířata s tělesnou hmotností, jež je o dvě směrodatné odchylky nižší než střední hmotnost mláďat v příslušném vrhu), jelikož nejsou pravděpodobně reprezentativními zástupci experimentální skupiny.

V PND 21 jsou vybraní jedinci F_1 generace následujícím způsobem náhodně zařazeni do jedné ze tří kohort zvířat:

kohorta 1 (1 A a 1B) = zkoušení toxicity pro reprodukci/vývoj,

kohorta 2 (2 A a 2B) = zkoušení vývojové neurotoxicity,

kohorta 3 = zkoušení vývojové imunotoxicity.

Kohorta 1 A: jeden samec a jedna samice z vrhu a skupiny (20/pohlaví/skupinu): prioritní výběr pro primární posouzení účinků na rozmnožovací soustavu a hodnocení obecné toxicity.

Kohorta 1B: jeden samec a jedna samice z vrhu a skupiny (20/pohlaví/skupinu): prioritní výběr pro následné posouzení reprodukčního výkonu pářením zvířat F_1 generace, když je to předepsáno (viz pokyn OECD č. 117 (39)), a pro získání dalších údajů o histopatologických vyšetřeních v případě podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty nebo v případě, kdy jsou výsledky z kohorty 1 A dvojznačné.

Kohorta 2 A: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; jeden samec nebo jedna samice z každého vrhu) přidělených pro účely neurobehaviorálních zkoušek následovaných neurohistopatologickým posouzením u dospělých.

Kohorta 2B: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; jeden samec nebo jedna samice z každého vrhu) přidělených pro účely neurohistopatologického posouzení při odstavení (PND 21 nebo PND 22). Pokud není dostatek zvířat, měla by být zvířata přednostně zařazena do kohorty 2 A.

Kohorta 3: celkem 20 mláďat na skupinu (10 samců a 10 samic na skupinu; pokud možno z každého vrhu jeden jedinec). Další mláďata z kontrolní skupiny mohou být použita pro pozitivní kontrolu při zkoušce protilátkové odezvy závislé na T buňkách (TDAR) v PND 56 ± 3 .

34. Pokud by ve vrhu byl nedostatek mláďat na to, aby mohla být zařazena do všech kohort, má přednost kohorta č. 1, jelikož může být rozšířena o produkci F_2 generace. V případě specifické potřeby lze do kterékoli z kohort zařadit další mláďata, např. pokud existuje podezření, že daná chemická látka je neurotoxikant, imunotoxikant nebo reprodukční toxikant. Tato mláďata lze využít ke zkouškám v jiných časových intervalech nebo pro hodnocení doplňujících ukazatelů. Mláďata, která nebudou zařazena do kohort, budou podrobena klinickým biochemickým vyšetřením (odstavec 55) a celkové pitvě (odstavec 68).

Druhé páření zvířat P generace

35. Druhé páření není u zvířat P generace zpravidla doporučováno, jelikož probíhá na úkor ztráty důležitých informací o počtu implantačních míst (a tedy údajů o postimplantačních a perinatálních ztrátách, indikátorů o možném teratogenním potenciálu) pro první vrh. Potřeba ověřit nebo objasnit účinek u samic, které byly vystaveny expozici, by byla uspokojena lépe, pokud by studie byla rozšířena o páření F_1 generace. Avšak druhé páření samců P generace se samicemi, kterým nebyla podávána daná chemická látka, je vždy možností, jak vyjasnit nejednoznačné nálezy nebo dále charakterizovat účinky na plodnost pozorované při prvním páření.

POZOROVÁNÍ ŽIVÝCH ZVÍŘAT

Poznatky z klinického pozorování

36. U zvířat P generace a vybraných zvířat F_1 generace se všeobecné klinické pozorování provádí jednou denně. V případě podávání dávek žaludeční sondou by klinické pozorování mělo proběhnout před podáním a po podání dávky (za účelem zjištění případných známek toxicity spojených se špičkovou koncentrací plazmy). Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodloužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Dvakrát denně, o víkendech jednou denně, se provede vyšetření všech zvířat za účelem zjištění závažné toxicity, morbidity a mortality.
37. Navíc se jednou týdně provede podrobnější vyšetření všech zvířat P a F_1 generace (po odstavení), přičemž toto vyšetření lze příhodně provádět při vážení zvířete, což by minimalizovalo stres z manipulace. Pozorování by měla být prováděna pečlivě a měla by být zaznamenávána pomocí systémů hodnocení, které byly definovány zkušebními laboratořmi. Je třeba se pokusit zajistit, aby rozdíly mezi podmínkami zkoušek byly minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. vytrvalých čistících pohybů nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškození, pohybu pozpátku).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

38. Zvířata P generace jsou vážena první den podání dávky a poté nejméně jednou týdně. Kromě toho jsou samice P generace váženy během laktace ve stejné dny, ve které probíhá vážení mláďat z jejich vrhů (viz odstavec 44). Všechna zvířata F₁ generace jsou vážena individuálně při odstavení (PND 21) a poté nejméně jednou týdně. Tělesná hmotnost je také zaznamenána v den, kdy dosáhnou puberty (dokončení odloučení předkožky nebo vaginální průchodnosti). Všechna zvířata jsou vážena při utracení.
39. Během studie je nejméně jednou týdně ve stejné dny jako vážení tělesné hmotnosti zvířat (s výjimkou období kohabitace) zaznamenávána spotřeba potravy a vody (v případě podávání zkoušené chemické látky v pitné vodě). Spotřeba potravy v každé kleci zvířat F₁ generace je počínaje výběrem do příslušné kohorty zaznamenávána jednou týdně.

Estrální cyklus

40. Předběžné informace o účincích zkoušené chemické látky na estrální cyklus mohou být k dispozici již z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování a lze je použít při sestavování zkušebního postupu specifického pro zkoušenou chemickou látku, který se týká rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Hodnocení estrálních cyklů (při vaginální cytologii) začne zpravidla na začátku období expozice a bude pokračovat až do potvrzení páření nebo do konce dvoutýdenního období páření. Pokud před aplikací proběhl screening samic z hlediska normálního estrálního cyklu, je pak vhodné pokračovat se stěry i po zahájení aplikace. Pokud však existuje podezření na nespecifické účinky při zahájení expozice (např. počáteční výrazné snížení spotřeby potravy), může být zvířatům dána možnost adaptace na expozici po dobu až dvou týdnů před zahájením dvoutýdenního období odběru stěrů trvajících až do páření. Pokud je období expozice látky samicím takto prodlouženo (tj. na čtyřtýdenní aplikaci před pářením), měl by být zvážěn nákup mladších zvířat a prodloužení období expozice samic před pářením. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně tak nevyvolat stav falešné březosti (10) (11).
41. Vaginální stěry by měly být od začátku vaginální průchodnosti zkoumány každý den u všech samic F₁ generace v kohortě 1 A, dokud nebude zaznamenán první stěr zrohovatělých buněk, aby bylo možno určit časový interval mezi těmito dvěma událostmi. Estrální cykly všech samic F₁ generace v kohortě 1 A by měly být monitorovány po dobu dvou týdnů, a to přibližně od PND 75. Kromě toho, bude-li nutné páření F₁ generace, bude po období spárování až okamžiku odhalení důkazů o spáření následovat vaginální cytologie v kohortě 1B.

Páření a březost

42. Kromě standardních ukazatelů (např. tělesná hmotnost, spotřeba potravy, klinická pozorování včetně kontroly mortality/morbidit), jsou zaznamenána data páření, datum oplodnění a datum vrhu a vypočítá se prekoitální interval (páření až oplodnění) a trvání březosti (oplodnění až vrh). Samice P generace by měly být v době očekávaného vrhu pečlivě prohlédnuty, zda nevykazují známky dystokie. Měly by být zaznamenány jakékoli anomálie při tvorbě hnízda nebo péči o mláďata.
43. Den, kdy dojde k vrhu, je pro samici nultý den laktace (LD 0) a pro potomstvo nultý postnatální den (PND 0). Případně mohou veškerá srovnání vycházet také z postkoitální doby, aby se eliminovaly nejasnosti v údajích o postnatálním vývoji na základě rozdílů v trvání březosti; mělo by být však zaznamenáno i načasování v souvislosti s vrhem. To je důležité zejména tehdy, když zkoušená chemická látka vykazuje vliv na trvání březosti.

Parametry potomstva

44. Vrhly se vyšetří co nejdříve po vrhu (PND 0 nebo 1), aby bylo možno stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvých a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií (z vnějšku patrné anomálie, mezi něž patří rozštěp patra, podkožní krevní výrony, abnormální barva nebo textura kůže, přítomnost pupeční šňůry, nedostatek mléka v žaludku, přítomnost suchých sekretů). Kromě toho první klinické vyšetření novorozeneckých mláďat zahrnuje kvalitativní hodnocení tělesné teploty, stav aktivity a reakci na manipulaci. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v PND 0 nebo později, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti. Živá mláďata se spočítají, každé se zváží v PND 0 nebo PND 1 a poté v pravidelných intervalech, např. alespoň v PND 4, 7, 14 a 21. Klinické vyšetření dle stáří zvířat se zopakuje při vážení potomstva nebo častěji, pokud byly při narození učiněny specifické

nálezy. Zaznamenané příznaky by mohly mimo jiné zahrnovat externí anomálie, změny kůže, srsti, očí, sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí. Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování nebo bizarního chování.

45. U každého mláděte je třeba nejméně jednou v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (12). V PND 12 nebo 13 se zkontroluje přítomnost bradavek/prsních dvorců u mladých samců.
46. Všechna vybraná zvířata F_1 generace jsou každý den posuzována z hlediska odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic, anebo tato pozorování mohou započít před dnem, kdy se očekává dosažení těchto ukazatelů, aby se zjistilo, zda pohlavní zralost nastane brzy. Zaznamenají se jakékoli anomálie pohlavních orgánů, jako je perzistentní vaginální vlákno, hypospadie nebo rozštěp penisu. Pohlavní zralost zvířat F_1 generace je porovnávána s fyzickým vývojem při určení stáří a tělesné hmotnosti v případě odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic (13).

Posouzení potenciální vývojové neurotoxicity (kohorty 2 A a 2B)

47. Pro posouzení neurotoxicity se použije deset samců a deset samic z kohorty 2 A a deset samců a deset samic z kohorty 2B z každé experimentální skupiny (za každou kohortu: jeden samec nebo jedna samice z vrhu; všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr). U zvířat z kohorty 2 A jsou posuzovány reakce na nečekané zvukové podněty, je provedena funkční pozorovací baterie, je provedeno vyšetření motorické činnosti (viz odstavce 48–50) a neuropatologická vyšetření (viz odstavce 74–75). Je třeba zajistit, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách jen minimální a nesouvisely systematicky s aplikací. Mezi proměnnými, které mohou ovlivnit chování, jsou hladina zvuku (např. přerušovaný hluk), teplota, vlhkost, osvětlení, zápachy, denní doba a odchylky v životním prostředí. Výsledky zkoušek neurotoxicity by měly být interpretovány v souvislosti s náležitými historickými kontrolními referenčními rozmezími. Zvířata kohorty 2B by měla být použita k neuropatologickému posouzení v PND 21 nebo 22 (viz odstavce 74–75).
48. Zkouška odezvy na nečekané zvukové podněty se provede v PND 24 (± 1 den) na zvířatech z kohorty 2 A. Den zkoušek by měl být rovnoměrně rozložen napříč skupinami, jimž je podávána daná chemická látka, a kontrolními skupinami. Každá sekce je tvořena 50 pokusy. Při provádění zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty se stanoví střední reakční amplituda v každém bloku deseti pokusů (pět bloků o deseti pokusech), přičemž zkušební podmínky by měly být optimalizovány tak, aby byla zajištěna habituace uvnitř sekce. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).
49. Ve vhodnou dobu mezi PND 63 a PND 75 jsou zvířata z kohorty 2 A podrobena funkční pozorovací baterii a automatizované zkoušce motorické činnosti. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušebními metodami B.43 (33) a B.53 (35). Součástí funkční pozorovací baterie je důkladný popis vzhledu, chování a funkční integrity subjektu. Tyto parametry se hodnotí na základě pozorování v chovné kleci, po přesunu do standardního pozorovacího prostoru (otevřený prostor), kde se zvíře pohybuje volně, a při manipulačních zkouškách. Při zkouškách se postupuje od té nejméně až po tu nejvíce pozorovány interaktivní. Seznam sledovaných parametrů je uveden v dodatku 1. Všechna zvířata by měla být pečlivě pozorována zkušenými pracovníky, kteří nemají informaci o skupině, do které zvíře patří, za použití standardizovaných postupů, které by měly minimalizovat variabilitu způsobenou pozorovatelem. Doporučuje se, aby zvířata hodnotila v dané zkoušce pokud možno tatáž osoba. Není-li to možné, je potřebné mít nějaký odhad spolehlivosti mezi osobami provádějícími vyšetření. U každého parametru funkční pozorovací baterie se používají explicitní definované stupnice a kritéria hodnocení. Pro ukazatele, kde se používá subjektivní posouzení, je třeba definovat objektivní kvantitativní kritéria. V případě motorické činnosti je každé zvíře testováno individuálně. Zkouška by měla trvat dostatečně dlouho na to, aby u kontrolní skupiny mohla být prokázána habituace v rámci sekce. Motorická činnost se monitoruje pomocí zařízení pro automatický záznam aktivity, které je schopno odhalit nárůst i pokles aktivity (tj. základní aktivita změřená zařízením by neměla být tak nízká, aby bylo vyloučeno odhalení poklesů, ani tak vysoká, aby bylo vyloučeno odhalení nárůstu činnosti). Každé zařízení by mělo být otestováno standardními postupy, aby byla v možném rozsahu zajištěna spolehlivost provozu zařízení v příslušné dny. Pokud jde o zařízení, experimentální skupiny by měly být co nejvyváženější. Experimentální skupiny by měly být vyváženě zastoupeny ve zkušebních časech, aby se předešlo zkreslení denním rytmem činnosti.
50. Pokud stávající informace naznačují potřebu dalších funkčních zkoušek (např. smyslových, sociálních, kognitivních), měly by takové zkoušky být zařazeny tak, aby nebyla ohrožena integrita ostatních hodnocení prováděných v rámci studie. Pokud jsou tyto zkoušky prováděny u stejných zvířat, u kterých byly prováděny standardní

zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty, hodnocení funkční pozorovací baterie a zkoušky motorické činnosti, měly by být naplánovány jiné zkoušky, aby se minimalizovalo riziko ohrožení integrity těchto zkoušek. Pokud empirické pozorování, předpokládané účinky nebo mechanismus/způsob účinku naznačují specifický typ neurotoxicity, mohou být obzvláště užitečné doplňující postupy.

Posouzení potenciální vývojové imunotoxicity (kohorta 3)

51. V PND 56 (± 3 dny) se deset samců a deset samic z kohorty 3 z každé experimentální skupiny (jeden samec nebo jedna samice z vrhu; všechny vrhy zastoupeny nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr) použije v testu protilátkové odezvy závislé na T buňkách, tj. ve zkoušce primární IgM protilátkové odezvy na antigen závislý na T buňkách, jako je např. SRBC test využívající ovčích krvinek nebo test KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) s využitím hemocyaninu mořského členovce *Megathura crenulata*, konzistentní se současnými postupy imunotoxikologických zkoušek (14) (15). Odezvu lze zhodnotit tak, že se spočítají specifické buňky vytvářející plak (PFC, *plaque-forming cells*) na slezině nebo že se určí titr protilátky IgM specifické pro SRBC nebo KLH v séru metodou ELISA při maximální odpovědi. Odpověď zpravidla vrcholí čtyři (počet PFC) nebo pět dní (metoda ELISA) po nitrožilní imunizaci. Pokud je primární protilátková odpověď analyzována spočítáním buněk vytvářejících plak, je přípustné zhodnotit podskupiny zvířat v oddělené dny za předpokladu, že: imunizace a utracení podskupiny jsou načasovány tak, že PFC jsou počítány na vrcholu odpovědi; že podskupiny obsahují stejný počet samců a samicích potomků ze všech dávkových skupin, včetně kontrolních skupin; a že podskupiny jsou hodnoceny v dobu přibližně stejného postnatálního stáří. Expozice zkoušené chemické látky bude pokračovat až do dne před odběrem slezin pro účely reakce PFC nebo séra pro účely analýzy ELISA.

Následné hodnocení potenciální toxicity pro reprodukci (kohorta 1B)

52. Zvířata z kohorty 1B lze zachovat pro účely aplikace i po PND 90 a lze je chovat s cílem získat v případě potřeby F_2 generaci. Samci a samice z téže dávkové skupiny by měli být páření (přičemž je třeba zamezit páření sourozenců) až po dobu dvou týdnů počínaje po PND 90 nejdéle však do PND 120. Postupuje se podobně jako u zvířat P generace. Avšak na základě posouzení závažnosti důkazů možná postačí, když budou vrhy utráceny v PND 4 a nebudou sledovány až do odstavení nebo ještě déle.

KONEČNÁ POZOROVÁNÍ

Klinická biochemická/hematologická vyšetření

53. U zvířat P generace se sledují systémové účinky. Při utracení jsou deseti náhodně vybraným samcům a samicím P generace z každé dávkové skupiny odebrány nalačno krevní vzorky z definovaného místa, které jsou uloženy za vhodných podmínek a podrobeny částečnému nebo komplexnímu hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, analýze T4 a TSH nebo jiným vyšetřením vyplývajícím z profilu známého účinku zkoušené chemické látky (viz pokyn OECD č. 151 (40)). Zkoumají se tyto hematologické parametry: hematokrity, koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů, počet krevních destiček a srážlivost krve (čas/potenciál). Vyšetření plazmy nebo séra zahrnují: glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinin, celkové bílkoviny, albumin a nejméně dva enzymy ukazující na hepatocelulární účinky (jako např. alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gamma-glutamyltranspeptidáza a sorbitoldehydrogenasa). Za určitých okolností lze získat užitečné informace měřením dalších enzymů a žlučových kyselin. Mimo to lze krev odebrat všem zvířatům a uložit ji pro případnou pozdější analýzu, aby bylo možné vyjasnit nejednoznačné účinky nebo získat údaje o interní expozici. Pokud není zamýšleno druhé páření zvířat P generace, jsou krevní vzorky odebrány těsně před procesem plánovaného utracení nebo v jeho rámci. V případě zachování zvířat se krevní vzorky shromáždí několik dní před druhým pářením zvířat. Pokud existující údaje ze studií s opakovaným podáváním dávek neuvádějí, že daný parametr není zkoušenou chemickou látkou dotčen, provede se analýza moči před utracením a zhodnotí se následující parametry: vzhled, objem, osmolalita nebo hustota, pH, přítomnost bílkovin, glukózy, krve a krvinek, buněčné zbytky. Moč lze také odebrat pro účely monitorování vylučování zkoušené chemické látky a/nebo metabolitu/ů.
54. U zvířat F_1 generace se sledují systémové účinky. Při utracení jsou deseti náhodně vybraným samcům a samicím z kohorty 1 A z každé dávkové skupiny odebrány nalačno krevní vzorky z definovaného místa, které jsou uloženy za vhodných podmínek a podrobeny standardnímu klinickému biochemickému vyšetření, včetně posouzení sérových hladin hormonů štítné žlázy (T4 a TSH), hematologického vyšetření (celkový a diferenciální počet leukocytů a počet erytrocytů) a vyšetření moči.

55. U přebytečných mláďat je v PND 4 provedena celková pitva a je na uvážení, zda provést měření koncentrací hormonu štítné žlázy (T4) v séru. V případě potřeby lze krev novorozených mláďat (PND 4) z jednotlivých vrhů smíchat použít pro biochemické analýzy/analýzy hormonu štítné žlázy. Krev pro analýzu T4 a TSH je také odebrána odstaveným jedincům, u nichž byla v PND 22 provedena celková pitva (mláďata F_1 generace nevybraná do kohort).

Parametry spermatu

56. Parametry spermatu se změří u všech samců P generace, pokud dostupné údaje neukazují, že během devadesátidenní studie parametry spermií nebyly postiženy. Parametry spermií se zkoumají u všech samců z kohorty 1 A.
57. Při ukončení studie je u všech samců P a F_1 generace (kohorta 1 A) zaznamenána hmotnost varlat a nadvarlat. Nejméně jedno varle a jedno nadvarle je vyhrazeno pro histopatologické vyšetření. Zbývající nadvarle se použije ke spočítání zásoby spermií v ocasu nadvarlete (16) (17). Kromě toho se z ocasu nadvarlete (nebo chámovodu) pro účely posouzení motility a morfologie spermií odebere sperma pomocí metod, které minimalizují poškození.
58. Motilitu spermií lze vyhodnotit buď bezprostředně po utracení, nebo lze provést záznam pro pozdější analýzu. Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně pomocí počítačové analýzy pohyblivosti (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pro účely hodnocení morfologie spermií se vzorky epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) vyšetří jako fixované nebo vlhké (25) a (minimálně 200 na vzorek) klasifikují se jako normální (jako normální se jeví hlava i střední část/bíčík), nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií zahrnují spojení, izolované hlavičky a zdeformované hlavičky a/nebo bíčíky (26). Zdeformované nebo velké hlavičky spermií mohou poukazovat na defekty tvorby spermií.
59. Pokud jsou vzorky spermií při pitvě zmrazeny, stěry zakonzervovány a pořízeny obrazové záznamy pro analýzu motility spermií (27), lze následnou analýzu omezit na kontrolní samce a na samce, jimž byly podávány vysoké dávky. Pokud se však zjistí účinky spojené s aplikací, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Celková pitva

60. Po utracení nebo uhynutí během studie jsou všechna zvířata P a F_1 generace podrobena pitvě a vyšetřena makroskopicky na jakékoliv strukturální anomálie anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede záznam o této skutečnosti a vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčin uhynutí.
61. U samic P a F_1 generace se v den pitvy vyšetří vaginální stěr s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením pohlavních orgánů. Děloha všech samic P generace (a případně F_1) se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

Hmotnost orgánů a uchování tkání – dospělá zvířata P a F_1 generace

62. V okamžiku utracení se u všech zvířat P generace a všech dospělých zvířat F_1 generace z příslušných kohort (jak je uvedeno níže) stanoví tělesná hmotnost a hmotnost dále uvedených orgánů ve vlhkém stavu co nejdříve po pitvě, aby nedošlo k vyschnutí. Tyto orgány se poté uchovávají za vhodných podmínek. Není-li stanoveno jinak, párové orgány se mohou zvážet odděleně nebo společně, a sice v souladu s obvyklou praxí dané laboratoře.

— děloha (s vejcovody a děložním hrdlem), vaječníky,

— varlata, nadvarlata (celkem a kaudální část pro vzorky použité ke stanovení počtu spermií),

— prostata (dorzolaterální a ventrální části společně). Při odstraňování celku prostaty je třeba postupovat opatrně, aby nedošlo k propíchnutí semenných váčků naplněných kapalinou. V případě účinku aplikace látky na celkovou hmotnost prostaty by dorzolaterální a ventrální části měly být po fixaci pitvány opatrně a měly by být zváženy samostatně,

- semenné vajíčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami (jako jedna jednotka),
 - mozek, játra, ledviny, slezina, brzlík, hypofýza, štítná žláza (po fixaci), nadledvinky a známé cílové orgány nebo tkáně.
63. Kromě orgánů uvedených výše se za vhodných podmínek uchovávají vzorky periferního nervu, svalů, míchy, oka s očním nervem, trávicí soustavy, močového měchýře, plic, průdušnice (s připojenou štítnou žlázou a příštítnými tělísky), kostní dřeň, chánovodu (samci), prsní žlázy (samci a samice) a vaginy.
64. Všechny orgány zvířat kohorty 1 A se zváží a uchovají pro účely histopatologického vyšetření.
65. Pro účely zkoumání prenatalně a postnatalně indukovaných imunotoxických účinků bude deset samců a deset samic z kohorty 1 A z každé exponované skupiny (jeden samec nebo jedna samice z vrhu, všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr) podrobeno při utracení následujícím krokům:
- vážení lymfatických uzlin spojených i nespojených se způsobem expozice (kromě hmotnosti nadledvinek, brzlíku a sleziny již zvážených u všech zvířat z kohorty 1 A),
 - analýza subpopulace lymfocytů ve slezině (CD4+ a CD8+ T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky) v jedné polovině sleziny, druhá polovina bude uložena pro histopatologické posouzení.
- Analýza subpopulací lymfocytů ve slezině u neimunizovaných zvířat (kohorta 1 A) stanoví, zda expozice souvisí se změnou v imunologické rovnovážné distribuci ‚pomocných‘ (CD4+) nebo cytotoxických (CD8+) lymfocytů odvozených z brzlíku nebo NK buněk (rychlé reakce na neoplastické buňky a patogeny).
66. U zvířat kohorty 1 A se zváží následující orgány a odpovídající tkáně se zpracují do stadia bločků:
- vagina (nevážená),
 - děloha s děložním hrdlem,
 - vaječníky,
 - varlata (alespoň jedno),
 - nadvarlata,
 - semenné vajíčky a koagulační žlázy,
 - prostata,
 - hypofýza,
 - určené cílové orgány.

V kohortě 1B se provede histopatologické vyšetření, pokud výsledky z kohorty 1 A budou nejednoznačné nebo bude existovat podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty.

67. Kohorty 2a a 2B: zkouška vývojové neurotoxicity (PND 21 nebo PND 22 a dospělé potomstvo). Zvířata kohorty 2 A jsou utrácena po zkouškách chování, přičemž je zaznamenána hmotnost mozku a je provedeno kompletní neurohistopatologické vyšetření pro účely neurotoxikologického posouzení. Zvířata kohorty 2B jsou utrácena v PND 21 nebo PND 22, přičemž je zaznamenána hmotnost mozku a je provedeno mikroskopické vyšetření mozku pro účely neurotoxikologického posouzení. Perfúzní fixace se provádí povinně u zvířat kohorty 2 A a je volitelná u zvířat kohorty 2B, postup je uveden v metodě B.53 (35).

Hmotnost orgánů a uchování tkání – odstavení potomci generace F₁

68. Mláďata, která nejsou vybrána do kohort, včetně zakrslých mláďat, jsou po odstavení, v PND 22, utrácena, pokud z výsledků nevyplývá potřeba dalších vyšetření za života. Utracená mláďata jsou v souladu s odstavci 62 a 63 podrobená celkové pitvě, která zahrnuje posouzení rozmnožovacích orgánů. U maximálně deseti mláďat od každého pohlaví a skupiny, z co největšího počtu vrhů, se váží mozek, slezina a brzlík, které se uchovají za vhodných podmínek. Kromě toho lze pro další mikroskopickou analýzu ⁽¹⁾(viz pokyn OECD č. 151 (40)) uchovat prsní tkáně těchto mladých samců a samic. Strukturní abnormality a cílové tkáně se uloží pro případné histologické vyšetření.

⁽¹⁾ Výzkum ukázal, že prsní žláza, zejména v období jejího raného vývoje, je citlivým ukazatelem účinku estrogenu. Doporučuje se, aby do této zkušební metody byly po validaci zahrnuty ukazatele zahrnující prsní žlázy mláďat obou pohlaví.

Histopatologická vyšetření – zvířata P generace

69. Je provedeno úplné histologické vyšetření orgánů vyjmenovaných v odstavcích 62 a 63 u všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a kontrolní skupiny P generace. Na pomoc při určování NOAEL by u všech zvířat ze skupin s nižšími dávkami měly být vyšetřeny orgány vykazující změny související s aplikací. Histopatologické vyšetření se navíc provede u rozmnožovacích orgánů všech zvířat, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, oplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií, a u všech tkání s výraznými lézemi.

Histopatologická vyšetření – zvířata F₁ generace*Zvířata kohorty 1*

70. U všech dospělých zvířat kohorty 1 A z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou je provedeno celkové histologické vyšetření orgánů vyjmenovaných v odstavcích 62 a 63. Všechny vrhy by měly být zastoupeny nejméně jedním mládětem od každého pohlaví. Na pomoc při určování NOAEL by u všech zvířat ze skupin s nižšími dávkami měly být vyšetřeny orgány a tkáně vykazující změny související s aplikací a všechny tkáně s výraznými lézemi. Pro hodnocení prenatalně a postnatalně indukovaných účinků na lymfatické orgány bude u deseti samců a deseti samic z kohorty 1 A provedeno vedle histopatologického hodnocení brzlíku, sleziny a nadledvinek, které bylo již provedeno u všech zvířat 1 A, také histopatologické vyšetření odebraných lymfatických uzlin a kostní dřeně.
71. V případě podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty by měly být vyšetřeny reprodukční a endokrinní tkáně všech zvířat kohorty 1B zpracované do stadia bločků, jak je uvedeno v odstavci 66. Zvířata kohorty 1B by také měla být podrobena histologickému vyšetření, pokud jsou výsledky z kohorty 1 A nejednoznačné.
72. Vaječníky dospělých samic by měly obsahovat primordiální a rostoucí folikuly i žlutá tělíska. Z tohoto důvodu by histopatologické vyšetření mělo být zaměřeno na kvantitativní hodnocení primordiálních a malých rostoucích folikulů i žlutých tělísek u samic F₁ generace. Je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječníků a velikost vzorků řezů pro použitý způsob hodnocení. Nejprve může být proveden výpočet počtu folikulů u zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou a v případě nepříznivých účinků by měly být potom hodnoceny i skupiny s nižšími dávkami. Pro porovnání exponovaných a kontrolních vaječníků by měl být zjišťován počet primordiálních folikulů, což může být kombinováno s počítáním malých rostoucích folikulů (viz pokyn OECD č. 151 (40)). Posouzení žlutých tělísek je třeba provést souběžně s hodnocením estrálních cyklů, aby mohlo být při posouzení vzato v úvahu stadium cyklu. Vejcovod, děloha a vagina jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán.
73. U samců F₁ generace jsou provedena podrobná histopatologická vyšetření varlat s cílem identifikovat účinky související s aplikací na diferenciaci a vývoj varlat a na spermatogenezi (38). Pokud je to možné, měly by být vyšetřeny řezy síti *rete testis*. Hlava, tělo a ocas nadvarlete a chámovod jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán, jakož i z hlediska parametrů požadovaných pro samce P generace.

Zvířata kohorty 2

74. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2 A obou pohlaví se po dokončení neurobehaviorálních zkoušek (po PND 75, nejpozději však v PND 90) provede neurohistopatologické vyšetření. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2B obou pohlaví se v PND 21 nebo PND 22 provede histopatologické vyšetření mozku. Orgány nebo tkáně vykazující změny související s aplikací by měly být vyšetřeny u zvířat ze skupin s nižší dávkou s cílem pomoci při určování NOAEL. U zvířat kohorty 2 A a 2B je vyšetřeno více řezů mozku, aby bylo možno vyšetřit čichový bulbus, mozkovou kůru, hippocampus, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek (tectum, tegmentum a pedunculi cerebrales), mozkový kmen a mozeček. Pouze u kohorty 2 A jsou vyšetřeny oči (sítnice a oční nerv) a vzorky periferního nervu, svalů a míchy. Všechny neurohistologické postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).
75. V reprezentativních částech mozku (homologické řezy pečlivě vybrané na základě spolehlivých mikroskopických vývojových znaků) by měla být provedena morfometrická (kvantitativní) hodnocení, která mohou zahrnovat lineární a/nebo plošná měření konkrétních částí mozku. Na každé úrovni by měly být provedeny nejméně tři po sobě jdoucí řezy s cílem vybrat co nejvíce homologní a reprezentativní řez pro konkrétní hodnocenou část mozku. Neuropatolog by měl náležitě posoudit, zda řezy připravené k měření jsou homologní s ostatními

v souboru vzorků, a tudíž je vhodné je zahrnout, jelikož zejména lineární měření se mohou v relativně krátké vzdálenosti změnit (28). Neměly by se používat nehomologické řezy. Ačkoli cílem je odebrat vzorky všem zvířatům vyčleněným pro tento účel (10/pohlaví/úroveň dávky), mohou i přesto být adekvátní menší počty. Avšak vzorky od méně než šesti zvířat jednoho pohlaví a jedné dávky by pro účely této zkušební metody nebyly považovány za dostatečné. Pro identifikaci účinků souvisejících s aplikací na parametry, jako je objem nebo počet buněk pro konkrétní neuroanatomické oblasti, lze použít stereologii. Všechny aspekty přípravy vzorků tkání, od fixace tkáně, přes sekci vzorků tkání, zpracování tkání a obarvení preparátů, by měly být vyváženě organizovány tak, aby každá šarže obsahovala reprezentativní vzorky z každé dávkové skupiny. Když mají být provedeny morfometrické nebo stereologické analýzy, pak by měla být mozková tkáň zalita do příslušného média u všech dávkových skupin současně, aby se zamezilo vzniku artefaktů smrštění, k čemuž dochází v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Údaje

76. Údaje jsou předkládány pro každé jednotlivé zvíře zvlášť a jsou shrnuty ve formě tabulek. Kde je to vhodné, jsou pro každou zkušební skupinu a každou generaci předkládány následující údaje: počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů a doba úmrtí nebo humanitního utracení, počet plodných zvířat, počet březích samic, počet samic s vrhem a počet zvířat vykazujících příznaky toxicity. Měl by být uváděn i popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti.
77. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a uznávanou statistickou metodou. Statistické metody se zvolí jako součást plánu studie a měly by náležitě hodnotit i údaje s jinou než normální distribucí (např. údaje o počtech), ohraničené údaje (např. omezený čas pozorování), závislost proměnných (např. účinky na vrh a opakovaná měření) a rozdílnost rozptylů. Generalizované lineární smíšené modely a modely závislosti účinku na dávce zahrnují širokou skupinu analytických nástrojů, které mohou být vhodné pro údaje vygenerované v rámci této zkušební metody. Zpráva by měla obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu vyhodnotit/znovu vyhodnotit nezávislý posuzovatel/statistik.

Vyhodnocení výsledků

78. Nález by měly být vyhodnoceny z hlediska pozorovaných účinků, včetně pitvy a mikroskopických nálezů. Hodnocení zahrnuje vztah, nebo jeho absenci, mezi dávkou a přítomností, frekvencí a závažností anomálií, včetně významných lézí. Posouzeny by měly být též cílové orgány, plodnost, klinické anomálie, reprodukční parametry a parametry vrhu, změny tělesné hmotnosti, mortalita a jakékoli další toxické a vývojové účinky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat změnám u jednotlivých pohlaví. Při hodnocení výsledků zkoušek je třeba brát v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, a jsou-li k dispozici, toxikokinetické údaje, včetně placentárního přenosu a vylučování mléka.

Závěrečná zpráva

79. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto údaje z provedené studie o zvířatech P a F₁ generace, popř. také F₂ generace:

Zkoušená chemická látka:

- veškeré dostupné informace o chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastnostech zkoušené chemické látky,
- identifikační údaje,
- čistota.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý živočišný druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,
- údaje o vaginálních stěrech u samic P generace před zahájením aplikace (pokud byly stěry v tuto dobu prováděny),
- záznamy o párování zvířat P generace s uvedením samčího a samčího partnera a úspěch páření,
- u dospělých zvířat F₁ generace záznam o vrhu, ze kterého pocházejí.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- podrobné údaje o složení aplikační formy zkoušené chemické látky nebo o přípravě směsi s krmivem, o dosažené koncentraci,
- stabilita a homogenita přípravku ve vehikulu nebo nosiči (např. strava, pitná voda), v krvi a/nebo mléku za podmínek použití a uložení mezi jednotlivými použitými,
- podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,
- v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené chemické látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,
- podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně složení krmné směsi, je-li k dispozici),
- podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění a rozdělení mláďat do zkušebních skupin,
- podmínky prostředí,
- seznam pracovníků provádějících zkoušky, včetně odborného školení.

Výsledky (souhrnné a individuální údaje podle pohlaví a dávky):

- spotřeba potravy, spotřeba vody (je-li k dispozici), využití potravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy, kromě období kohabitace a laktace) a spotřeba zkoušené chemické látky (podle způsobu podávání potravy/pitné vody) u zvířat P a F₁ generace,
- údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),
- údaje o tělesné hmotnosti zvířat P generace,
- údaje o tělesné hmotnosti u vybraných zvířat F₁ generace po odstavení,
- den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,
- povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (zda příznaky jsou vratné, či ne),
- údaje o hematologickém vyšetření, vyšetření moči a klinickém chemickém vyšetření včetně TSH a T4,
- fenotypická analýza slezinných buněk (T, B, NK buňky),
- celularita kostní dřeně,
- údaje o toxických reakcích,
- počet samic P a F₁ generace s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,
- čas do páření (prekoitální interval, počet dnů mezi spárováním a spářením),
- toxické nebo jiné účinky na reprodukci, včetně počtu a procenta zvířat, která se spářila, jsou březí, vrhla a mají laktaci, samců, kteří přivedli březost, samic se známkami dystokie/prodlužovaného nebo ztíženého vrhu,
- trvání březosti, a proběhl-li, údaj o vrhu,
- počty implantovaných plodů, velikost vrhu a procento samčích mláďat,

- počet a procento postimplantačních ztrát, živě a mrtvě narozených mláďat,
- údaje o hmotnosti vrhu a hmotnosti mláďat (samci, samice a dohromady), počet zakrslých mláďat, byl-li stanoven,
- počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami,
- toxické nebo jiné účinky na potomstvo, postnatální růst, životaschopnost apod.,
- údaje o fyzických vývojových milnících u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji,
- údaje o pohlavní zralosti zvířat F_1 generace,
- případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,
- tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u zvířat P generace a dospělých zvířat F_1 generace,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými anomáliemi u samců P a F_1 generace,
- případně počty a maturační stadia folikulů ve vaječnících u samic P a F_1 generace,
- generace výpočet počtu žlutých tělísek ve vaječnících samic F_1 generace,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné.

Parametry kohorty 2:

- Podrobný popis postupů použitých ke standardizaci pozorování a postupů, jakož i definice pro hodnocení s použitím skóre,
- seznam všech použitých zkušebních postupů a odůvodnění jejich použití,
- podrobnosti o behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,
- postupy pro kalibraci a zajištění ekvivalence u těchto zařízení a proporcionálním složení experimentálních skupin při zkušebních postupech,
- krátké odůvodnění vysvětlující jakákoli rozhodnutí zahrnující profesní úsudek,
- podrobný popis všech behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických nálezů ve skupinách podle pohlaví a podle dávky, včetně nárůstu a poklesů u kontrolních skupin,
- hmotnost mozku,
- jakékoli diagnózy odvozené od neurologických známek a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo podmínek,
- optické záznamy typických nálezů,
- optické záznamy s nízkofrekvenčními filtry pro posouzení shodnosti řezů použitých k morfometrii,
- statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých k analýze údajů a výsledků bez ohledu na to, zda jsou významné či nikoli,
- význam jakýchkoli dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky, ve skupinách podle pohlaví a podle dávky,
- vliv jakýchkoli toxikokinetických údajů na závěry,
- údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (tj. pozitivní a historické kontrolní údaje),
- vztahy, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,
- NOAEL nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a dávkové skupiny,
- diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou neurotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

Parametry kohorty 3:

- titry protilátek IgM v séru (senzibilizace na SRBC nebo KLH) nebo PFC jednotky IgM ve slezině (senzibilizace na SRBC),
- správné provádění metody TDAR by mělo být u laboratoře, která vykonává zkoušku poprvé, prokázáno v procesu optimalizace metody, u všech laboratoří pak pravidelně (např. jednou ročně),
- diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou imunotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

*Diskuse o výsledcích**Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na rodiče a potomstvo*

Měly by být poskytnuty veškeré informace nezískané během studie, ale přínosné pro interpretaci výsledků (např. podobnost účinků jakýchkoli známých neurotoxikantů).

Interpretace výsledků

80. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poskytne v případě potřeby informace o účincích opakované expozice chemické látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčním systému a o vývoji, růstu, přežití a funkčních ukazatelích potomstva do PND 90.
81. Při interpretaci výsledků studie by měly být vzaty v úvahu všechny dostupné informace o chemické látce, včetně fyzikálně-chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastností, dostupné podstatné informace o analogických strukturách a výsledky předchozích studií toxicity se zkoušenou chemickou látkou (např. akutní toxicita, toxicita po opakovaném podání, mechanistické studie a studie posuzující, zda existují podstatné kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi druhy, pokud jde o metabolické procesy *in vivo* a *in vitro*). Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislosti s výsledky zjištěnými v jiných studiích s opakovaným dávkováním. Při zpomalení růstu u potomstva by mohl být brán v úvahu vliv zkoušené chemické látky na složení mléka (29).

Kohorta 2 (vývojová neurotoxicita)

82. Výsledky neurobehaviorálních a neuropatologických vyšetření by měly být interpretovány v kontextu všech nálezů s využitím metody posouzení závažnosti důkazů a odborného úsudku. Měly by být prodiskutovány vzorce behaviorálních nebo morfologických nálezů, jsou-li přítomny, jakož i důkazy o závislosti odpovědi na dávce. Do této charakterizace by mělo být zahrnuto hodnocení vývojové neurotoxicity, včetně humánních epidemiologických studií nebo případových zpráv a studií pokusných zvířat (např. toxikokinetické údaje, informace o vztazích mezi strukturou a aktivitou, údaje z jiných studií toxicity). Součástí hodnocení údajů by měla být diskuse biologického i statistického významu. Hodnocení by mělo zahrnovat případný vztah mezi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálními změnami. Pokyny k interpretaci výsledků vyšetření v souvislosti s vývojovou neurotoxiciou odkazují na zkušební metodu B.53 (35) a práci autorů Tyla et al., 2008 (31).

Kohorta 3 (vývojová imunotoxicita)

83. Potlačení nebo podpoření imunitních funkcí vyhodnocené metodou TDAR (protilátková odezva závislá na T buňkách) by mělo být posuzováno v kontextu všech provedených pozorování. Významnost výsledku TDAR může být podpořena jinými účinky na indikátory související s imunitou (např. celularita kostní dřeně, hmotnost a histopatologické vyšetření lymfatických tkání, distribuce podsouborů lymfocytů). Účinky stanovené pomocí TDAR mohou být méně smysluplné v případě jiných toxicit pozorovaných při nižších expozičních koncentracích.
84. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a neurotoxicity by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (26).

LITERATURA

- 1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

- 2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.
- 3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- 4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87–94.
- 5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.
- 6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.
- 7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.
- 8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000), 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.
- 9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408–415.
- 10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84–97.
- 11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- 12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.
- 13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.
- 14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.
- 15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.
- 16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.
- 17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103–107.
- 18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat', *Reproductive Toxicology*, 5, 39–44.
- 19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.
- 20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.
- 21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

- 22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.
 - 23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida, s. 319–333.
 - 24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.
 - 25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.
 - 26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 - 27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility' *Journal of Andrology*, 8, 330–337.
 - 28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.
 - 29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.
 - 30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717–1726.
 - 31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.
 - 32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 - 33) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.
 - 34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 - 35) Kapitola B.53 této přílohy, Studie vývojové neurotoxicity.
 - 36) Kapitola B.54 této přílohy, Uterotrofní biologická zkouška na hlodavcích: Krátkodobá screeningová zkouška estrogenních vlastností.
 - 37) Kapitola B.55 této přílohy, Hershbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.
 - 38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 - 39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 - 40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

Dodatek 1

Opatření a pozorování zahrnutá do funkční pozorovací baterie (Kohorta 2 A)

Chovná klec a otevřený prostor	Manipulační	Fyziologická
Poloha	Snadnost přemístění	Teplota
Nedobrovolné klonické a tonické pohyby	Snadnost manipulace	Tělesná hmotnost
Srostlá víčka	Svalový tonus	Reakce zorniček
Naježení chlupů	Reakce při přiblížení	Velikost zorniček
Tvorba slin	Reakce na dotyk	
Tvorba slz	Reakce na zvukový podnět	
Vydávání zvuků	Reakce na sevření ocasu	
Odchov	Vzpřimovací reakce	
Anomálie chůze	Roztažení zadních nohou při pádu z výšky	
Vzrušení	Síla úchopu předních končetin	
Stereotypy v chování	Síla úchopu zadních končetin	
Zvláštní chování		
Skvrny		
Respirační anomálie		

Dodatek 2

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

B.57 ZKOUŠKA STEROIDOGENEZE H295R

ÚVOD

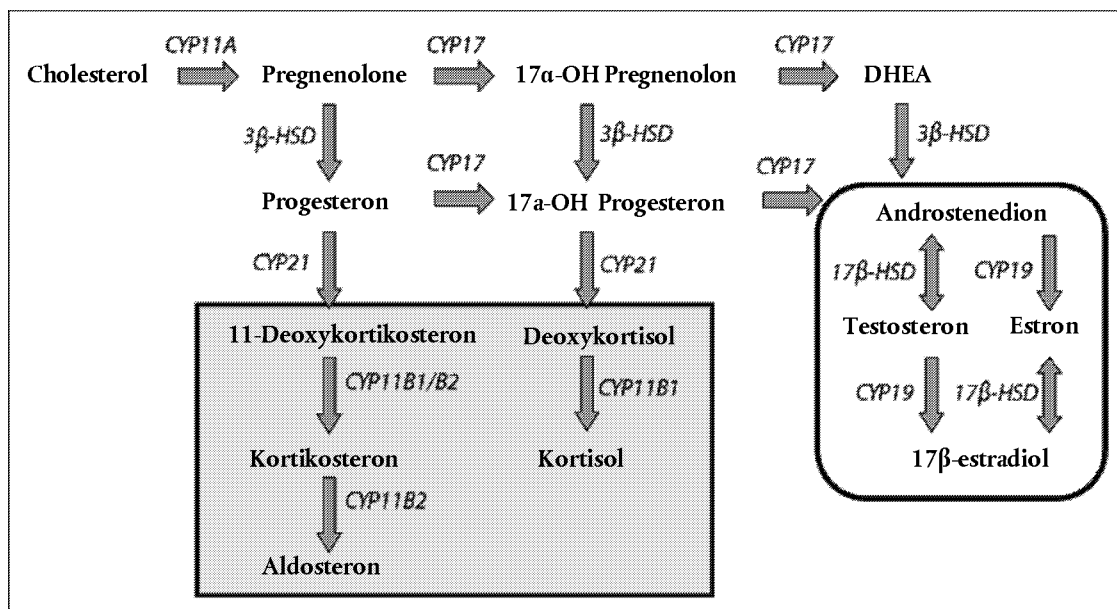
1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení (TG) 456 (2011). V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. Koncepční rámec OECD z roku 2002 pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti (1). Zkouška steroidogeneze *in vitro* H295R (zkouška H295R) popsaná v této zkušební metodě využívá lidskou buněčnou linii adrenálního karcinomu (buňky NCI-H295R) a představuje úroveň 2 konceptního rámce: „zkoušky *in vitro* poskytující mechanistické údaje“ pro účely screeningu a stanovení priorit. Vývoj a standardizace zkoušky jako screeningu pro chemické účinky na steroidogenezi, konkrétně na produkci estradiolu (E2) a testosteronu (T), proběhly formou vícestupňového procesu. Zkouška H295R byla optimalizována a validována (2) (3) (4) (5).
2. Cílem zkoušky steroidogeneze H295R je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci hormonů E2 a T. Cílem zkoušky H295R je identifikovat xenobiotika, která mají jako své cílové místo, případně cílová místa, endogenní složky, které zahrnují nitrobuněčnou biochemickou dráhu začínající řadou reakcí počínaje cholesterolem až po produkci E2 a/nebo T. Účelem zkoušky H295R není identifikovat chemické látky, které mají vliv na steroidogenezi z důvodu účinků na osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG). Cílem zkoušky je poskytnout odpověď ANO/NE, pokud jde o potenciál chemické látky vyvolávat nebo tlumit produkci hormonů T a E2. V některých případech však mohou být získány kvantitativní výsledky (viz odstavce 53 a 54). Výsledky zkoušky jsou vyjádřeny jako relativní změny v produkci hormonu v porovnání s kontrolami pomocí rozpouštědel (SC). Účelem zkoušky není poskytnout specifické mechanistické informace týkající se interakce zkoušené chemické látky s endokrinním systémem. Proběhly výzkumy, které používaly tuto buněčnou linii k identifikaci účinků na specifické enzymy a meziproduktové hormony, např. progesteron (2).
3. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku. Podrobný pracovní postup včetně pokynů, jak připravit roztoky, kultivovat buňky a provádět různé aspekty zkoušek, je k dispozici v dodatku I–III dokumentu OECD „Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production“ (4).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Biosyntézy pohlavních steroidních hormonů se účastní pět různých enzymů, které působí jako katalyzátor v šesti různých reakcích. Enzymatická konverze cholesterolu na pregnenolon cytochromem P450 (CYP), konkrétně štěpením cholesterolového bočního řetězce enzymem CYP11 A, představuje úvodní krok v sérii biochemických reakcí, které vrcholí syntézou steroidních konečných produktů. V závislosti na pořadí dalších dvou reakcí se steroidogenní dráha rozdvíhá, na Δ^5 -hydroxysteroidní dráhu a Δ^4 -ketosteroidní dráhu, které se sbíhají v produkci androstendionu (obrázek 1).
5. Androstendion se přeměňuje na testosteron (T) působením 17β -hydroxysteroid dehydrogenasou (17β -HSD). Testosteron je meziprodukt i konečný produkt/hormon. V mužském těle se T může přeměnit na dihydrotestosteron (DHT) díky 5α -reduktáze, která se nachází v buněčných membránách, jaderném obalu a endoplazmatickém retikulu cílových tkání androgenního působení, např. v prostatě a semenných váčcích. DHT je jako androgen výrazně účinnější než T a je též považován za konečný hormon. Zkouška H295R nedetekuje DHT (viz odstavec 10).
6. Enzym na steroidogenní dráze, který přeměňuje androgenní chemické látky na estrogenní chemické látky, je aromatáza (CYP19). CYP19 přeměňuje T na 17β -estradiol (E2) a androstendion na estron. E2 a T jsou považovány za konečné hormony steroidogenní dráhy.
7. Specifičnost činnosti lyázy CYP17 se mezi druhy liší z hlediska intermediálních substrátů. U lidí enzym upřednostňuje substráty Δ^5 -hydroxysteroidní dráhy (pregnenolon), zatímco substráty na Δ^4 -ketosteroidní dráze (progesteron) jsou upřednostňovány u potkanů (19). Takové rozdíly v činnosti lyázy CYP17 mohou vysvětlovat některé rozdíly závislé na daném živočišném druhu v reakci na chemické látky, které mění steroidogenezi *in vivo* (6). Bylo prokázáno, že buňky H295R nejlépe odrážejí expresi adrenálního enzymu a vzorec produkce steroidů u dospělých osob (20), ale je známo, že zajišťují expresi enzymů jak pro Δ^5 -hydroxysteroidní, tak pro Δ^4 -ketosteroidní dráhu androgenní syntézy (7) (11) (13) (15).

Obrázek 1

Steroidogenní dráha v buňkách H295R



Poznámka:

Enzymy jsou psány kurzivou, hormony jsou psány tučně a šipky značí směr syntézy. Šedé pozadí značí kortikosteroidní dráhy/produkty. Dráhy/produkty pohlavních steroidů jsou v bílém poli. CYP = cytochrom P450; HSD = hydroxysteroidní dehydrogenasa; DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Lidská buněčná linie adrenálního karcinomu H295R je užitečným modelem *in vitro* pro zkoumání účinků na syntézu steroidních hormonů (2) (7) (8) (9) (10). Buněčná linie H295R má exprimovány geny, které kódují všechny klíčové enzymy pro steroidogenezi uvedenou výše (11) (15) (obrázek 1). To je jedinečná vlastnost, protože exprese těchto genů *in vivo* je specifická z hlediska tkáně a vývojového stadia, přičemž zpravidla žádná tkáň ani žádné vývojové stadium neexprimuje všechny geny účastnící se steroidogeneze (2). Buňky H295R mají fyziologické charakteristiky zonálně nediferencovaných adrenálních buněk lidského plodu (11). Tyto buňky představují jedinečný systém *in vitro* v tom, že mají schopnost produkovat veškeré steroidní hormony, které se nacházejí v kůře nadledvin a v pohlavních žlázách, což umožňuje provést zkoušky jak účinků na kortikosteroidovou syntézu, tak účinků na produkci pohlavních steroidních hormonů, jako jsou androgeny a estrogeny, ačkoli zkouška byla validována pouze pro detekci hormonů T a E2. Změny, které tento zkušební systém zaznamenává ve formě změn v produkci T a E2, mohou být výsledkem velkého množství různých interakcí zkoušených chemických látek se steroidogenními funkcemi, které probíhají v buňkách H295R. Patří mezi ně modulační exprese, syntézy nebo funkce enzymů, které se účastní produkce, přeměny nebo eliminace steroidních hormonů (12) (13) (14). Inhibice produkce hormonů může být způsobena přímou kompetitivní vazbou na enzym v této dráze účinkem na kofaktory jako jsou NADPH (nikotinamidadeninindinukleotidfosfát) a cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), a/nebo zvýšením metabolismu steroidů nebo potlačením genové exprese určitých enzymů v dráze steroidogeneze. Zatímco inhibice může být funkcí jak přímých, tak nepřímých procesů účastnících se produkce hormonů, indukce má zpravidla nepřímý charakter, například ovlivňuje kofaktory, jako jsou NADPH a cAMP (stejně jako v případě forskolinu), snižuje metabolismus steroidů (13) a/nebo zvyšuje steroidogenní genovou expresi.
9. Zkouška H295R má několik výhod:
 - umožňuje odhalení nárůstů i poklesů v produkci T i E2,
 - dovoluje přímé zhodnocení případného vlivu chemické látky na buněčnou životaschopnost/cytotoxicitu. To je důležitá vlastnost, protože umožňuje rozlišení účinků, které jsou vyvolány cytotoxicitou, a účinků, které jsou vyvolány přímou interakcí chemických látek se steroidogenními drahami, což není možné v systémech tkáňových explantátů, které jsou tvořeny mnoha buněčnými typy s proměnlivou citlivostí a funkcí,

- není nutné využívat zvířata,
- buněčná linie H295R je komerčně dodávána.

10. Základní omezení zkoušky jsou následující:

- Není známa její metabolická schopnost, ale pravděpodobně je dost omezená; chemické látky, které musí být metabolicky aktivovány, pravděpodobně nebudou v této zkoušce zachyceny.
- Jelikož je H295R získávána z tkáně nadledvin, obsahuje enzymy schopné produkovat glukokortikoidy, stejně jako pohlavní hormony. Z tohoto důvodu by účinky na produkci glukokortikoidů mohly ovlivnit úroveň hormonů T a E2 pozorované ve zkoušce.
- Neměří DHT, a tudíž se neočekává, že by při ní byly odhaleny chemické látky, které inhibují 5 α -reduktázu. V takovém případě lze použít Hershbergerovu zkoušku (16).
- Zkouška H295R neodhalí chemické látky, které zasahují do steroidogeneze tím, že postihují osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG), protože tu lze studovat pouze u zvířat *in vivo*.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Účelem této zkoušky je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci T a E2. T je také meziproduktem na dráze k produkci E2. Zkouška může odhalit chemické látky, které zpravidla inhibují anebo indukují enzymy dráhy steroidogeneze.
12. Zkouška se obvykle provádí za standardních podmínek kultivace buněk v 24jamkových kultivačních destičkách. Případně lze k provedení zkoušky použít jiné velikosti destiček. Nasazení buněk a experimentální podmínky by však měly být podle toho upraveny tak, aby byl zachován soulad s kritérii provedení testu.
13. Po aklimatizačním období v délce 24 hodin ve vícejamkových destičkách jsou buňky po dobu 48 hodin vystaveny sedmi koncentracím zkoušené chemické látky, alespoň ve třech souběžných experimentech/opakováních. Rozpouštědlo a známý inhibitor a induktor produkce hormonů v určené koncentraci jsou použity jako negativní a pozitivní kontroly. Na konci období expozice je médium ze všech jamek odstraněno. Bezprostředně po odstranění média je analyzována životaschopnost buněk v každé jamce. Koncentrace hormonů v médiu lze měřit pomocí celé řady metod včetně komerčně dostupných sad k měření hormonů a/nebo přístrojových technik, jako je kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Údaje jsou vyjádřeny jako násobná změna vztažená k negativní kontrole (rozpouštědlo) a jako nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou pozorovány účinky (*Lowest-Observed-Effect-Concentration*, LOEC). Je-li zkouška negativní, je nejvyšší testovaná koncentrace označena jako nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (*No-Observed-Effect-Concentration*, NOEC). Závěry týkající se schopnosti chemické látky ovlivnit steroidogenezi by měly vycházet nejméně ze dvou nezávislých pokusů. První pokus může fungovat jako pokus zjišťující rozmezí dávek případně s následnou úpravou koncentrací pro pokusy 2 a 3, pokud se objeví problémy s rozpustností nebo cytotoxicitou nebo pokud se zdá, že aktivita chemické látky je na hranici rozpětí zkoušených koncentrací.

KULTIVACE

Buněčná linie

14. Buňky NCI-H295R lze komerčně získat z *American Type Culture Collections* (ATCC) po podpisu smlouvy o prodeji materiálu (*Material Transfer Agreement*, MTA) ⁽¹⁾.

Úvod

15. Z důvodu změn schopnosti buněk produkovat E2 se zvyšujícím se stářím/počtem pasáží (2) by kultivace buněk měla před jejich použitím probíhat v souladu s konkrétním pracovním postupem a měl by být zaznamenán počet pasáží od rozmrazení buněk i číslo/pořadí pasáže, v níž byly buňky zmrazeny a umístěny do kapalného dusíku. První číslo uvádí skutečný počet buněčných pasáží a druhé číslo popisuje číslo pasáže, v níž byly buňky zmrazeny a uloženy. Například buňky, které byly zmrazeny po pasáži pět a rozmrazeny a poté byly třikrát rozděleny (čtyři pasáže počítající čerstvě rozmražené buňky se počítají jako pasáž 1) by poté, co byly opět kultivovány, byly označeny jako pasáž 4,5. Příklad schématu číslování je uveden v dodatku I validační zprávy (4).
16. Jako základ pro obohacené médium a mrazicí médium se použije zásobní médium. Obohacené médium je nezbytnou součástí kultivace buněk. Mrazicí médium je speciálně navrženo tak, aby umožnilo ničím nedotčené

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

zmrazení buněk pro dlouhodobé skladování. Před použitím by z hlediska základních koncentrací T a E2 měla proběhnout analýza Nu-séra (nebo srovnatelného séra se stejnými vlastnostmi, kde bylo prokázáno, že splňuje požadavky na provedení zkoušky a kontrolu kvality), které je součástí obohaceného média. Příprava těchto roztoků je popsána v dodatku II validační zprávy (4).

17. Po zahájení kultivace buněk H295R z původní dodávky z ATCC by buňky měly růst po pět pasáží (tj. buňky jsou rozděleny čtyřikrát). Buňky pasáže 5 jsou poté zmrazeny v kapalném dusíku a uskladněny. Před zmrazením buněk je na destičce pro kontrolu kvality (QC-destičce) odebrán vzorek buněk předchozí pasáže 4 (viz odstavec 36 a 37), aby se ověřilo, zda bazální produkce hormonů a reakce pozitivní kontrolní látky splňují kritéria kontroly kvality zkoušky definovaná v tabulce 5.
18. Buňky H295R musí být kultivovány, zmrazeny a uchovávány v kapalném dusíku, aby bylo zajištěno, že pro účely kultivace a použití budou vždy k dispozici buňky příslušné pasáže/stáří. Aby to bylo přijatelné pro zkoušku H295R, tak pasáží po odebrání nové ⁽¹⁾ nebo zmrazené ⁽²⁾ dodávky buněk do kultury by nemělo být více než deset. Například přijatelné pasáže pro kultury buněk z dávky zmrazené v pasáži 5 by byly 4,5 až 10,5. U buněk kultivovaných z těchto zmrazených dávek by měl být dodržen postup popsáný v odstavci 19. Tyto buňky by se měly před použitím kultivovat alespoň čtyři (4) další pasáže (pasáž 4,5).

Aktivace buněk ze zmrazené zásoby

19. Postup pro aktivaci buněk ze zmrazené zásoby se uplatňuje tehdy, když se z uskladnění v kapalném dusíku vyjme pro účely kultivace a zkoušení nová dávka buněk. Podrobnosti o tomto postupu jsou stanoveny v dodatku III validační zprávy (4). Buňky jsou vyjmuty ze skladovacích nádob s kapalným dusíkem, rychle jsou rozmrazeny, umístěny do obohaceného média v centrifugační zkumavce, odstředěny při pokojové teplotě, opětovně suspendovány v obohaceném médiu a přeneseny do kultivační baňky. Médium by mělo být následující den vyměněno. Buňky H295R se kultivují v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % CO₂ ve vzduchové atmosféře a médium se obnovuje 2–3krát týdně. Jakmile buňky dosáhnou konfluencí přibližně 85–90 %, měly by být rozděleny. Rozdělení buněk je nezbytné pro zajištění zdraví a růstu buněk a pro zachování buněk pro účely provádění biologických zkoušek. Buňky jsou třikrát opláchnuty ve fyziologickém roztoku ve fosfátovém pufru (PBS, bez Ca²⁺ Mg²⁺) a vyňaty z kultivační baňky přidáním vhodného odlučovacího enzymu, např. trypsinu, do PBS (bez Ca²⁺ Mg²⁺). Bezprostředně po vynětí buněk z kultivační baňky by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrifugační zkumavky, odstředěny při pokojové teplotě, je odstraněn supernatant a sediment buněk se resuspenduje v obohaceném médiu. Příslušné množství buněčné suspenze se umístí do nové kultivační baňky. Toto množství buněčné suspenze by se mělo upravit tak, aby buňky dosáhly do 5–7 dnů konfluencí. Doporučený subkultivační poměr je 1:3 až 1:4. Destička by měla být pečlivě označena. Buňky jsou nyní připraveny k použití při zkoušce a přebytečné buňky by měly být podle odstavce 20 zmrazeny v kapalném dusíku.

Zmrazení buněk H295R (příprava buněk na skladování v kapalném dusíku)

20. Pro přípravu buněk H295R na zmrazení je zapotřebí dodržet postup popsáný výše u dělení buněk až do kroku resuspenze sedimentu buněk na dně odstředivkové zkumavky. Zde je sediment buněk resuspendován v mrazicím médiu. Roztok je přenesen do řádně označené kryogenní ampulky a zmrazen při teplotě – 80 °C na 24 hodin, po jejichž uplynutí je kryogenní ampulka přemístěna do kapalného dusíku k uskladnění. Podrobnosti o tomto postupu jsou stanoveny v dodatku III validační zprávy (4).

Umístění buněk na destičky a preinkubace před zkoušením

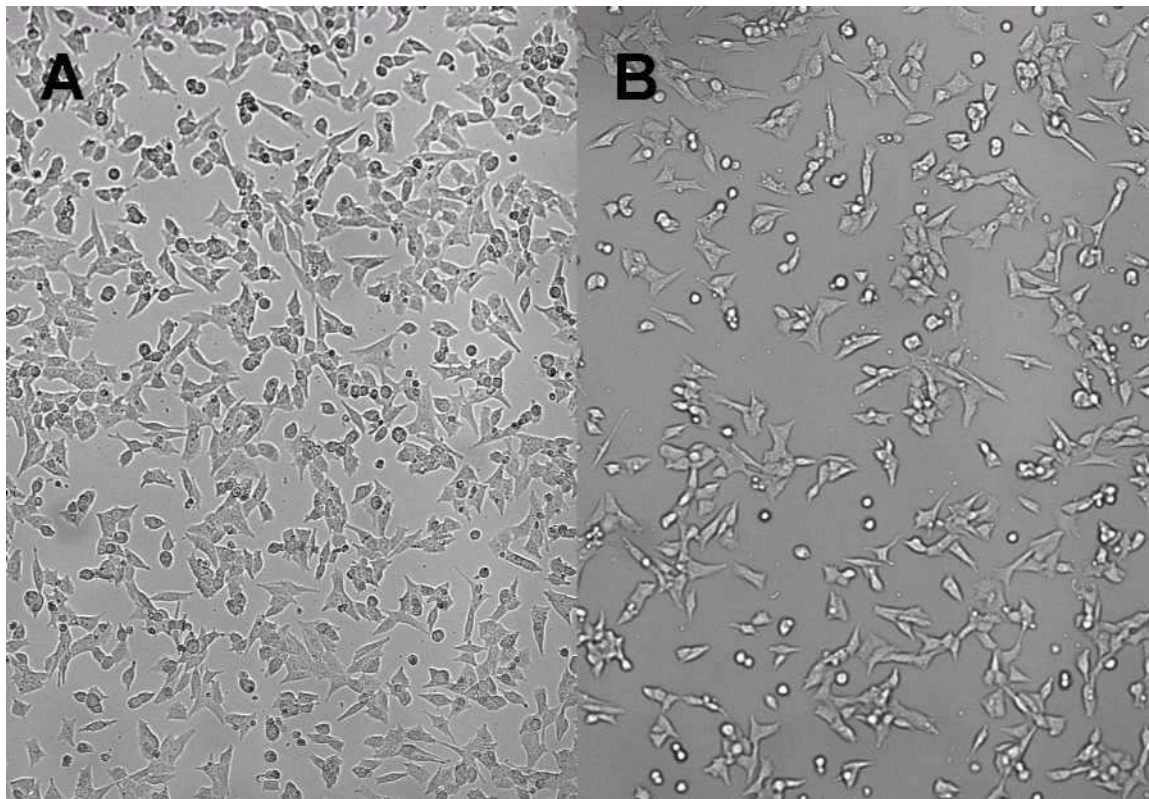
21. Počet 24jamkových destiček připravených podle odstavce 19, které budou zapotřebí, závisí na počtu zkoušených chemických látek a konfluenci buněk v kultivačních miskách. Zpravidla jedna kultivační baňka (75 cm²) buněk s 80–90 % konfluencí zajistí dostatečné množství buněk pro 1–1,5 (24jamkové) destičky při cílové hustotě 200 000 až 300 000 buněk na 1 ml média s výslednou přibližnou 50–60 % konfluencí v jamkách během 24 hodin (obrázek 2). To je obvykle optimální hustota buněk pro produkci hormonu při zkoušce. Při vyšších hustotách se vzorec produkce T i E2 mění. Před prvním provedením zkoušky se doporučuje vyzkoušet různé hustoty nasazení mezi 200 000 a 300 000 buňkami na 1 ml a pro další pokusy vybrat hustotu, která během 24 hodin přinese 50–60 % konfluenci v jamce.

⁽¹⁾ „Novou dávkou“ se rozumí čerstvá dávka buněk obdržena od ATCC.

⁽²⁾ „Zmrazenou dávkou“ se rozumí buňky, které byly dříve kultivovány a poté zmrazeny v jiné laboratoři, než je ATCC.

Obrázek 2

Mikrosnímek buněk H295R při 50 % hustotě nasazení v 24jamkové kultivační destičce po 24 hodinách pořízený na okraji (A) a ve středu (B) jamky



22. Médium je rozpipetováno z kultivační baňky a buňky jsou třikrát propláchnuty sterilním PBS (bez $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$). Je přidán roztok enzymu (v PBS) pro oddělení buněk od kultivační baňky. Po uplynutí náležité doby pro oddělení buněk by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrifugační zkumavky, odstředěny při pokojové teplotě, odstraní se supernatant a sediment buněk se resuspenduje v obohaceném médiu. Hustota buněk se vypočítá např. pomocí hemocytometru nebo počítáče buněk. Buněčná suspenze by měla být zředěna na požadovanou hustotu pro destičku a důkladně rozmíchána, aby byla zajištěna homogenní hustota buněk. Buňky by měly být umístěny na destičky s 1 ml buněčné suspenze na jamku a destičky a jamky by měly být označeny. Destičky s nasazenými buňkami se inkubují při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO_2 na dobu 24 hodin, aby se buňky mohly přichytit k jamkám.

POŽADAVKY KONTROLY KVALITY

23. Je velmi důležité, aby během dávkování byl do jamek umístěn přesný objem roztoků a vzorků, protože tento objem určuje koncentrace používané při počítání výsledků zkoušky.
24. Před zahájením kultivace buněk a jakýmkoli následným zkoušením by každá laboratoř měla doložit citlivost svého systému měření hormonů (odstavce 29–31).
25. Používají-li se zkoušky měření hormonu na základě protilátek, musí být před zahájením zkoušení provedena analýza zkoušených chemických látek, aby se zjistilo, zda mají potenciál působit rušivě na systém měření používaný ke kvantifikaci T a E2 podle odstavce 32.

26. Doporučovaným rozpouštědlem pro zkoušku je DMSO. Pokud se používá alternativní rozpouštědlo, je zapotřebí stanovit toto:
- rozpustnost zkoušené chemické látky, forskolinu a prochlorazu v rozpouštědle, a
 - cytotoxicitu jako funkci koncentrace rozpouštědla.
- Doporučuje se, aby maximální přípustná koncentrace rozpouštědla nepřekročila desetinásobek zředění nejmenší cytotoxické koncentrace rozpouštědla.
27. Před prvním provedením zkoušky by laboratoř měla provést kvalifikační pokus prokazující, že laboratoř je schopna udržet a dosáhnout vhodných kultivačních a experimentálních podmínek, které jsou požadovány pro zkoušení chemické látky podle odstavců 33–35.
28. Na začátku zkoušení při použití nové dávky buněk by před použitím nové dávky buněk ke zkoušení měl být proveden kontrolní experiment (destička pro kontrolu kvality – QC plate) ke zhodnocení vlastností buněk podle odstavců 36 a 37.

Fungování systému měření hormonů

Citlivost metody, přesnost, preciznost a křížová reaktivita s matricí vzorků

29. Každá laboratoř může k analýze produkce T a E2 buňkami H259R používat systém měření hormonů dle své volby, pokud splňuje kritéria provedení zkoušky, včetně meze kvantifikace (LOQ). Nominálně to je 100 pg/ml pro T a 10 pg/ml pro E2, které vycházejí z bazálních hladin hormonů pozorovaných ve validačních studiích. Avšak v závislosti na bazálních hladinách hormonů dosažených v provádějící laboratoři mohou být vhodné vyšší nebo nižší hladiny. Před zahájením pokusů s destičkou pro kontrolu kvality a pokusů v rámci zkoušky by laboratoř měla prokázat, že při uplatnění zkoušky hormonů lze změřit koncentrace hormonů v obohaceném médiu s dostatečnou přesností a precizností, aby mohla být při analýze obohaceného média doplněná o interní kontrolu hormonů splněna kritéria kontroly kvality specifikovaná v tabulkách 1 a 5. Obohacené médium by mělo být doplněno nejméně o tři koncentrace každého hormonu (např. 100, 500 a 2 500 pg/ml hormonu T; 10, 50 a 250 pg/ml hormonu E2; nebo pro nejnižší obohacené koncentrace T a E2 lze použít nejnižší možné koncentrace na základě limitů zjištění vybraného systému měření hormonů) a analyzováno. Naměřené koncentrace hormonů u neextrahovaných vzorků by měly spadat do rozmezí 30 % nominálních koncentrací a rozdíl mezi opakovanými měřeními téhož vzorku by neměl překročit 25 % (viz rovněž tabulka 8, kde jsou uvedena další kritéria kontroly kvality). Pokud jsou tato kritéria kontroly kvality splněna, předpokládá se, že vybraná metoda měření hormonů je dostatečně přesná, precizní a nedochází při ní ke křížové reakci se složkami média (matrice vzorků), tak, že by se očekával významný vliv na výsledek zkoušky. V tomto případě není vyžadována extrakce vzorků před měřením hormonů.
30. V případě, že kritéria kontroly kvality v tabulkách 1 a 8 nejsou splněna, může se objevit významný účinek matrice a měl by být proveden pokus s extrahovaným obohaceným médiem. Příklad postupu extrakce je popsán v dodatku II validační zprávy (4). Měření koncentrací hormonů v extrahovaných vzorcích by měla být provedena trojnásobně. ⁽¹⁾ Pokud lze dokázat, že po extrakci nenarušují složky média metodu zjišťování hormonů podle kritérií kontroly kvality, měly by být všechny další pokusy uskutečněny pomocí extrahovaných vzorků. Pokud kritéria kontroly kvality nelze po extrakci splnit, použitý systém měření hormonů není pro účely zkoušky steroidogeneze H259R vhodný a měla by se použít alternativní metoda zjišťování hormonů.

Standardní křivka

31. Koncentrace hormonů v kontrolních vzorcích rozpouštědla by měly být v rozmezí lineární části standardní křivky. V ideálním případě by se hodnoty kontrolních vzorků rozpouštědla měly pohybovat kolem středu lineární části, aby bylo zajištěno, že bude možné změřit indukci a inhibici syntézy hormonů. Podle toho je třeba vybrat zředění média (nebo extrakty), které budou měřeny. Lineární vztah se stanoví vhodným statistickým přístupem.

Zkouška interference chemické látky

32. Pokud se k měření hormonů použijí metody založené na protilátkách, jako jsou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) a radio-imunoanalýzy (RIA), měla by být každá chemická látka otestována z hlediska potenciální interference se systémem měření hormonů, který bude použit, a to ještě před zahájením vlastního zkoušení chemických látek (dodatek III validační zprávy (4)), protože některé chemické látky mohou s těmito zkouškami interferovat (17). Dochází-li k interferenci, která je ≥ 20 % bazální produkce hormonů pro T a/nebo E2, jak stanoví analýza hormonů, měl by u všech ředění zásobního roztoku zkoušené chemické látky

⁽¹⁾ Pozn.: Je-li požadována extrakce, jsou pro každý extrakt provedena tři opakovaná měření. Každý vzorek bude extrahován pouze jednou.

proběhnout test interference chemické látky s hormony při zkoušce (např. jak je popsáno v dodatku III validační zprávy (4) oddílu 5.0) s cílem určit prahovou dávku, při níž dochází k významné interferenci ($\geq 20\%$). Pokud je interference menší než 30% , výsledky lze opravit. Pokud interference přesáhne 30% , údaje jsou neplatné a údaje pro tyto koncentrace by měly být odstraněny. Pokud při více než jedné necytotoxické koncentraci dochází k významné interferenci zkoušené chemické látky se systémem měření hormonů, měl by se použít jiný systém měření hormonů. Aby se předešlo interferenci s kontaminujícími chemickými látkami, je doporučeno, aby hormony byly z média extrahovány pomocí vhodného rozpouštědla. Možné metody lze najít ve validační zprávě (4).

Tabulka 1

Kritéria provedení pro systémy měření hormonů

Parametr	Kritérium
Citlivost metody měření	Mez kvantifikace (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Účinnost extrakce hormonů (pouze pokud je extrakce nutná)	Průměrné podíly výtěžnosti (na základě tří měření) u standardního přídatku hormonu by se neměly odchýlovat od množství, které bylo přidáno, o více než 30% .
Interference chemické látky (pouze systémy na základě protilátek)	Nemělo by docházet k žádné podstatné ($\geq 30\%$ bazální produkce příslušného hormonu) křížové reaktivitě s kterýmkoli z hormonů produkováných buňkami ^(b) ^(c)

^(a) *Poznámka:* Limity metody měření vycházejí z hodnot bazální produkce hormonů uvedených v tabulce 5 a opírají se o provedení. Pokud lze dosáhnout vyšší bazální produkce hormonů, může být limit vyšší.

^(b) Některé protilátky T a E2 mohou při vyšším procentu křížově reagovat s androstendionem, resp. estronem. V takových případech nelze přesně určit účinky na 17 β -HSD. Údaje však i přesto mohou poskytnout užitečné informace týkající se účinků na produkci estrogenu nebo androgenu obecně. V takových případech by údaje měly být vyjádřeny spíše jako odpovědi na androgen/estrogen než E2 a T.

^(c) Patří mezi ně: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxykortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17 α -pregnenolon, 17 α -progesteron, deoxykortizol, kortizol, DHEA, androstendion, estron.

Test způsobilosti laboratoře

33. Před zkoušením neznámých chemických látek by laboratoř měla provedením testu způsobilosti prokázat, že je schopna dosáhnout náležitých podmínek pro kultivaci buněk a zkušebních podmínek, které jsou požadovány pro úspěšné provedení zkoušky, a udržet je. Jelikož uskutečnění zkoušky je přímo spojeno s pracovníky laboratoře, kteří budou danou zkoušku provádět, měly by být tyto postupy částečně zopakovány, pokud dojde ke změně laboratorního personálu.
34. Tento test způsobilosti bude uskutečněn za podmínek uvedených v odstavcích 38 až 40 tak, že buňky budou vystaveny sedmi rostoucím koncentracím silných, mírných a slabých induktorů a inhibitorů, jakož i negativní chemické látky (viz tabulka 2). Mezi chemické látky, které mají být zkoušeny, patří konkrétně silný induktor forskolin (č. CAS 66575-29-9), silný inhibitor prochloraz (č. CAS 67747-09-5), mírný induktor atrazin (č. CAS 1912-24-9), mírný inhibitor aminoglutethimid (č. CAS 125-84-8), slabý induktor (produkce E2) a slabý inhibitor (produkce T) bisfenol A (č. CAS 80-05-7) a negativní chemická látka choriogonadotropin (HCG) (č. CAS 9002-61-3) (viz tabulka 2). Pomocí formátu podle tabulky 6 jsou všechny chemické látky umísťovány do oddělených destiček. U chemických látek pro test způsobilosti by měla být v každém dnu zkoušení zařazena jedna QC-destička (tabulka 4, odstavce 36–37).

Tabulka 2

Chemické látky pro test způsobilosti a expoziční koncentrace

Chemická látka pro test způsobilosti	Expoziční koncentrace [μ M]
Prochloraz	0 ^(a) ; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolin	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30

Chemická látka pro test způsobilosti	Expoziční koncentrace [μM]
Atrazin	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutethimid	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenol A	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
HCG	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100

^(a) Kontrola rozpouštědla (DMSO) (0), 1 μl DMSO/jamka.

Při testu způsobilosti laboratoře by expozice buněk H295R chemickým látkám měla proběhnout v 24jamkových destičkách. U všech dávek zkoušených chemických látek se dávky stanovují v μM. Dávky by se měly podávat v DMSO při 0,1 % obj. na jamku. Všechny zkoušené koncentrace by měly být testovány ve třech jamkách (tabulka 6). Pro každou chemickou látku se používají oddělené destičky. V každém dnu zkoušení se zařadí jedna QC-destička.

35. Analýzy životaschopnosti buněk a hormonů by měly být provedeny v souladu s odstavci 42 až 46. Měly by být oznámeny prahová hodnota (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky, LOEC) a rozhodnutí o klasifikaci a měly by být porovnány s hodnotami v tabulce 3. Údaje jsou považovány za přijatelné, pokud splňují LOEC a klasifikaci v tabulce 3.

Tabulka 3

Prahové hodnoty (LOEC) a klasifikace výsledku pro chemické látky v testu způsobilosti

	Číslo CAS	LOEC [μM]		Klasifikace výsledku	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ^(a) (Inhibice)	+ (Inhibice)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Aminoglutethimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibice)	+ (Inhibice)
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibice)	+ (Indukce)
HCG	9002-61-3	nepoužije se	nepoužije se	negativní	negativní

^(a) +, pozitivní

nepoužije se – vzhledem k tomu, že po expozici necytotoxickým koncentracím negativní kontroly by nemělo dojít k žádným změnám.

Destička pro kontrolu kvality (Quality Control Plate), QC-destička

36. QC-destička se používá k ověření chování buněk H295R za standardních podmínek kultivace a k vytvoření dosavadní databáze koncentrací hormonů při kontrolách rozpouštědel, pozitivních a negativních kontrolách a při jiných opatřeních kontroly kvality v průběhu času.
- Chování buněk H295R by mělo být posuzováno pomocí QC-destičky pro každou novou dávku ATCC nebo po prvním použití dříve zmrazené zásoby buněk, pokud test způsobilosti laboratoře (odstavce 32–34) proběhl s touto dávkou buněk.
 - QC-destička zajišťuje kompletní posouzení podmínek zkoušky (např. životaschopnost buněk, kontroly rozpouštědel, negativní a pozitivní kontroly, jakož i rozdíly v rámci zkoušky a mezi zkouškami) při zkoušení chemických látek a měla by být součástí každé zkoušky.
37. Test kontroly kvality se provádí v 24jamkové destičce a probíhá stejnými postupy inkubace, dávkování, životaschopnosti buněk/cytotoxicity, extrakce hormonů a analýzy hormonů, které jsou popsány v odstavcích 38 až 46 pro zkoušení chemických látek. QC-destička obsahuje slepé pokusy, kontroly rozpouštědla a dvě koncentrace

známého induktoru (forskolin, 1, 10 μM) a inhibitoru (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntézy E2 a T. Kromě toho se ve vybraných jamkách používá jako pozitivní kontrola pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity MeOH. Podrobný popis rozvržení destičky obsahuje tabulka 4. Kritéria, která musí QC-destička splňovat, jsou vyjmenována v tabulce 5. Minimální bazální produkce hormonu u T a E2 by měla být splněna jak při kontrole rozpouštědla, tak v jamkách pro slepé pokusy.

Tabulka 4

Rozvržení QC-destičky pro zkoušení chování buněk H295R nevystavených expozici a buněk vystavených expozici známých inhibitorů (PRO = prochloraz) a stimulantů (FOR = forskolin) produkce E2 a T. Po ukončení pokusu s expozicí a odstranění média bude do všech jamek s MeOH přidán 70 % roztok metanolu, který poslouží jako pozitivní kontrola cytotoxicity (viz zkouška cytotoxicity v dodatku III validační zprávy (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Slepý pokus ^(a)	Slepý pokus ^(a)	Slepý pokus ^(a)	Slepý pokus ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Slepý pokus ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Slepý pokus ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

^(a) Buňky v jamkách pro slepý pokus dostanou pouze médium (tj. žádné rozpouštědlo).

^(b) Metanol (MeOH) bude přidán až po ukončení expozice a odstranění média z těchto jamek.

^(c) Kontrola rozpouštědla DMSO (1 μl /jamku).

Tabulka 5

Kritéria výsledků pro QC-destičku

	T	E2
Bazální produkce hormonu při kontrole rozpouštědla (SC)	≥ 5 násobek LOQ	$\geq 2,5$ násobek LOQ
Indukce (10 μM forskolinu)	$\geq 1,5$ násobek SC	$\geq 7,5$ násobek SC
Inhibice (1 μM prochlorazu)	$\leq 0,5$ násobek SC	$\leq 0,5$ násobek SC

POSTUP EXPOZICE CHEMICKÉ LÁTCE

38. Preinkubované buňky se vyjmou z inkubátoru (odstavec 21) a zkontrolují pod mikroskopem, aby před dávkováním bylo jisté, že jsou v dobrém stavu (přichycení, morfologie).
39. Buňky jsou umístěny do biologické bezpečnostní skříně (laminární box) a obohacené médium je odstraněno a nahrazeno novým obohaceným médiem (1 ml/jamku). Pro tuto zkušební metodu se jako rozpouštědlo upřednostňuje DMSO. Pokud je však důvod pro použití jiných rozpouštědel, mělo by být popsáno vědecké zdůvodnění. Buňky jsou vystaveny zkoušené chemické látce přidáním 1 μl vhodného zásobního roztoku v DMSO (viz dodatek II validační zprávy (4)) na 1 ml obohaceného média (objem jamky). Výsledkem toho je konečná

koncentrace 0,1 % DMSO v jamkách. Pro zajištění odpovídající směsi se obecně upřednostňuje, aby byl vhodný zásobní roztok zkoušené chemické látky v DMSO smíchán s obohaceným médiem, aby se dosáhlo požadované konečné koncentrace pro každou dávku a aby směs byla přidána do každé jamky bezprostředně po odstranění starého média. Je-li použita tato možnost, měla by koncentrace DMSO (0,1 %) zůstat ve všech jamkách stejná. U jamek obsahujících dvě největší koncentrace se vizuálně pomocí stereomikroskopu posoudí, zda se vytvořily sraženiny nebo zákal, což je známka neúplné rozpustnosti zkoušené chemické látky. Pokud jsou takové podmínky (zákal, tvorba sraženin) pozorovány, jsou přezkoumány i jamky obsahující další nižší koncentrace (a tak dále) a koncentrace, kde se látka zcela nerozpustila, musí být vyloučeny pro účely dalšího hodnocení a analýzy. Destička se na 48 hodin vrátí do inkubátoru při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO₂. Rozvržení destičky se zkoušenou chemickou látkou je uvedeno v tabulce 6. Zásoby 1–7 ukazují umístění rostoucích dávek zkoušené chemické látky.

Tabulka 6

Schéma dávkování pro expozici buněk H295R zkoušeným chemickým látkám v 24 jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Zásoba 4	Zásoba 4	Zásoba 4
B	Zásoba 1	Zásoba 1	Zásoba 1	Zásoba 5	Zásoba 5	Zásoba 5
C	Zásoba 2	Zásoba 2	Zásoba 2	Zásoba 6	Zásoba 6	Zásoba 6
D	Zásoba 3	Zásoba 3	Zásoba 3	Zásoba 7	Zásoba 7	Zásoba 7

40. Po 48 hodinách jsou expoziční destičky vyňaty z inkubátoru a každá jamka se zkontroluje pod mikroskopem ohledně stavu buněk (přichycení, morfologie, stupeň konfluence) a známek cytotoxicity. Médium z každé jamky je rozděleno na dvě stejná množství (každé přibližně 490 µl) a přeneseno do dvou samostatných, řádně označených ampulek (tj. jeden díl poskytuje pro každou jamku náhradní vzorek). Aby se předešlo vyschnutí buněk, odstraňuje se médium po řadách nebo sloupcích najednou a nahrazuje se médiem pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity buněk. Pokud je nutné životaschopnost/cytotoxicitu buněk změřit okamžitě, je do každé jamky přidáno 200 µl PBS s Ca²⁺ a Mg²⁺. Média se zmrazí při teplotě – 80 °C až do dalšího zpracování pro analýzu koncentrací hormonů (viz odstavce 44–46). I když hormony T a E2 uchovávané v médiu při teplotě – 80 °C jsou obecně stále po dobu nejméně tří měsíců, měla by být v každé laboratoři zdokumentována stálost hormonů během uskladnění.
41. Okamžitě po odstranění média se pro každou expoziční destičku určí životaschopnost buněk/cytotoxicita.

Určení životaschopnosti buněk

42. Pro určení potenciálního vlivu zkoušené chemické látky na životaschopnost buněk není metoda testování životaschopnosti buněk/cytotoxicity předepsána, je možno ji zvolit. Zkouška by měla být schopna měřit skutečnou výši procentního podílu životaschopných buněk přítomných v jamce nebo by mělo být prokázáno, že ji lze přímo srovnat se zkouškou Live/Dead® (její lineární funkcí) (viz dodatek III validační zprávy (4)). Alternativní zkouškou, u které se ukázalo, že funguje stejně dobře, je test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid] (18). Posouzení životaschopnosti buněk využívající výše uvedené metody je relativní měření, které nemusí nutně být lineární závislé na absolutním počtu buněk v jamce. Proto by analyzující pracovník měl provést subjektivní paralelní vizuální posouzení každé jamky a je zapotřebí udělat digitální snímky kontrol rozpouštědel a dvou největších necytotoxických koncentrací, které se archivují, aby bylo možno později posoudit skutečnou hustotu buněk, bude-li to zapotřebí. Pokud se na základě vizuální prohlídky nebo podle důkazů ze zkoušky životaschopnosti/cytotoxicity zdá, že počet buněk narostl, je nutné zdánlivý nárůst ověřit. Je-li nárůst počtu buněk ověřen, mělo by to být uvedeno v protokolu o zkoušce. Životaschopnost buněk bude vyjádřena v poměru k průměrné reakci při kontrolách s rozpouštědly, která je považována za 100 % životaschopných buněk, výpočet se provádí podle pravidel metody použité k určení cytotoxicity. Pro zkoušku MTT lze použít následující vzorec:

% životaschopných buněk = (reakce v jamce – průměrná reakce v jamkách s aplikovaným MeOH [= 100 % odumřelých]) ÷ (průměrná reakce v jamkách SC – průměrná reakce v jamkách s aplikovaným MeOH [= 100 % odumřelých])

43. Do závěrečné analýzy údajů by neměly být zařazeny jamky s životaschopností nižší než 80 %, v poměru k průměrné životaschopnosti při kontrolách s rozpouštědly (= 100 % životaschopnost). Inhibice steroidogeneze, vyskytující se při cytotoxicitě kolem 20 %, by měla být pečlivě posouzena, aby bylo zajištěno, že příčinou inhibice není právě cytotoxicita.

Analýza hormonů

44. Každá laboratoř může pro analýzu T a E2 použít systém měření hormonů podle své volby. Zbylé podíly média z každé experimentální skupiny lze použít pro přípravu dalších ředění tak, aby byly k dispozici koncentrace pro lineární část standardní křivky. Jak je uvedeno v odstavci 29, každá laboratoř by měla prokázat soulad svého systému měření hormonů (např. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kritérii pro kontrolu kvality tak, že provede analýzu obohaceného média doplněnou o vnitřní kontrolu hormonů před provedením pokusů pro kontrolu kvality nebo zkoušením chemických látek. Aby bylo zajištěno, že součásti systému zkoušení nebudou rušivě zasahovat do měření hormonů, bude možná zapotřebí hormony před jejich měřením z média extrahovat (viz odstavec 30 s podmínkami, za kterých je nebo není extrakce požadována). Doporučuje se provést extrakci v souladu s postupy uvedenými v dodatku III validační zprávy (4).
45. Pokud se k měření produkce hormonů používá komerční zkušební sada (kit), měla by být provedena analýza hormonů v souladu s manuálem, který dodal výrobce zkušební sady. Většina výrobců má jedinečný postup, kterým se mají analýzy hormonů provádět. Roztoky vzorků je třeba upravit, aby očekávané koncentrace hormonů pro kontroly roztoků spadaly do středu lineárního rozmezí standardní křivky konkrétní zkušební sady (dodatek III validační zprávy (4)). Hodnoty, které leží mimo lineární část standardní křivky, by měly být zamítnuty.
46. Konečné koncentrace hormonů se vypočítají takto:

Příklad:

Extrahováno:	450 µl média
Rekonstituováno v:	250 µl zkušebního pufu
Ředění při zkoušce:	1:10 (s cílem zajistit, aby se vzorek dostal do lineárního rozmezí standardní křivky)
Koncentrace hormonu při zkoušce:	150 pg/ml (již přizpůsobena koncentraci na 1 ml zkoušeného vzorku)
Výtěžnost:	89 %
Konečná koncentrace hormonů =	(Koncentrace hormonů (na 1 ml) ÷ výtěžnost) (faktor ředění)
Konečná koncentrace hormonů =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

Výběr zkušebních koncentrací

47. V rámci zkoušky by měly být provedeny minimálně dva nezávislé pokusy. Pokud starší informace, například informace o limitech rozpustnosti nebo cytotoxicitě neposkytují základ pro výběr zkušebních koncentrací, doporučuje se, aby zkušební koncentrace pro počáteční pokus byly voleny v intervalech logaritmické škály, přičemž 10^{-3} M je

maximální koncentrace. Pokud je chemická látka rozpustná a není při žádné ze zkoušených koncentrací cytotoxická a první pokus byl pro všechny koncentrace negativní, pak to musí být potvrzeno při jednom dalším pokusu za stejných podmínek, za jakých proběhl první pokus (tabulka 7). Pokud jsou výsledky prvního pokusu *nejednoznačné* (tj. násobek efektu je statisticky významně odlišný od kontrolní hodnoty pouze při jedné koncentraci) nebo *pozitivní* (tj. násobná změna je při dvou nebo více následujících koncentracích statisticky významná), zkouška by se měla zopakovat s upřesněním vybraných koncentrací, jak ukazuje tabulka 7. Aby se zjistil účinek, měly by být zkušební koncentrace v pokusech 2 a 3 (uskuteční-li se) upraveny na základě výsledků hraničních koncentrací úvodního pokusu, které vyvolaly účinek s použitím koncentrací v intervalech 1/2-log (např. pokud původní pokus 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM vyústil v indukce při 1 a 10 μM , koncentrace zkoušené ve druhém pokusu by měly být 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), pokud pro dosažení LOEC nemusí být uplatněny nižší koncentrace. Ve druhém uvedeném případě by ve druhém pokusu, při kterém se použije stupnice 1/2-log, mělo být použito nejméně pět koncentrací pod nejnižší koncentrací zkoušenou v prvním pokusu. Pokud druhý pokus nepotvrdí výsledky prvního pokusu (tj. při dříve pozitivně zkoušené koncentraci ± 1 přírůstek koncentrace neprokáže statistickou významnost), je nutné provést třetí experiment za původních zkušebních podmínek. *Nejednoznačné* výsledky v prvním pokusu jsou považovány za negativní, pokud pozorovaný účinek nemohl být potvrzen v žádném ze dvou následných pokusů. *Nejednoznačné* výsledky jsou považovány za pozitivní odpovědi (účinek), pokud lze odpověď potvrdit v nejméně jednom dalším pokusu v rámci ± 1 přírůstku koncentrace (viz oddíl 55 postupu při interpretaci údajů).

Tabulka 7

Matice rozhodnutí pro možné výsledné scénáře

Pokus 1	Pokus 2		Pokus 3		Rozhodnutí	
Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Pozitivní	Negativní
Negativní	Potvrdit ^(a)	Negativní	Konec			X
Negativní	Potvrdit ^(a)	Pozitivní	Upřesnit ^(b)	Negativní		X
Nejednoznačné	Upřesnit ^(b)	Negativní	Potvrdit ^(a)	Negativní		X
Nejednoznačné ^(c)	Upřesnit ^(b)	Negativní	Potvrdit ^(a)	Pozitivní	X	
Nejednoznačné ^(c)	Upřesnit ^(b)	Pozitivní			X	
Pozitivní	Upřesnit ^(b)	Negativní	Potvrdit ^(a)	Pozitivní	X	
Negativní	Potvrdit ^(a)	Pozitivní	Upřesnit ^(b)	Pozitivní	X	
Pozitivní	Upřesnit ^(b)	Pozitivní	Konec		X	

^(a) Potvrdit předchozí pokus pomocí stejné struktury experimentu.

^(b) Provést zkoušku znovu s intervalem koncentrací 1/2-log (stanovení meze u koncentrace, která při předchozím experimentu dopadla výrazně jinak).

^(c) Násobná změna při jedné koncentraci se ze statistického hlediska výrazně liší od kontrolní hodnoty.

Kontrola kvality testu

48. Kromě splnění kritérií pro QC-destičky by měla být splněna i další kritéria kvality, která jsou stanovena v tabulce 8 a která se týkají přijatelných variací mezi replikovanými jamkami, opakovanými experimenty, linearity a citlivosti systémů měření hormonů, rozdílu mezi opakovanými měřeními hormonů téhož vzorku, a procentní výtěžnosti standardního přídatku hormonů po extrakci média (je-li to použitelné; viz odstavec 30 ohledně požadavků extrakce). Aby údaje mohly být použity pro další hodnocení, měly by spadat do přijatelných rozmezí definovaných pro každý parametr. Pokud tato kritéria nejsou splněna, mělo by být do pracovního formuláře poznamenáno, že kritéria kontroly kvality nebyla u daného vzorku splněna a že je nutné vzorek analyzovat znovu nebo ho vypustit ze souboru údajů.

Tabulka 8

Přijatelná rozmezí a/nebo variace (%) pro parametry zkušební destičky pro zkoušku H295R.

LOQ: mez kvantifikace systému měření hormonů. CV: variační koeficient; SC: kontrola s rozpouštědlem; DPM: rozpad za minutu

	Srovnání mezi	T	E2
Bazální produkce hormonů při SC	O násobek větší než LOQ	≥ 5násobek	≥ 2,5násobek
Experimenty v oblasti expozice – v rámci CV destičky pro SC (replikované jamky)	Absolutní koncentrace	≤ 30 %	≤ 30 %
Experimenty v oblasti expozice – mezi destičkami CV pro SC (opakované experimenty)	Násobná změna	≤ 30 %	≤ 30 %
Systém měření hormonů – citlivost	Zjistitelný násobný pokles poměrný k SC	≥ 5násobek	≥ 2,5násobek
Systém měření hormonů – opakovaná měření CV pro SC ^(a)	Absolutní koncentrace	≤ 25 %	≤ 25 %
Extrakce média – výtěžnost interního 3H standardu (použije-li se)	DPM	≥ 65 % nominální	

^(a) Odkazuje na opakovaná měření téhož vzorku

ANALÝZA ÚDAJŮ A ZPRÁVY

Analýza údajů

49. Pro vyhodnocení relativního nárůstu/poklesu chemicky změněné produkce hormonů by se výsledky měly normalizovat na střední hodnotu kontroly s rozpouštědlem (*solvent control*, SC) u každé zkušební destičky a výsledky by se měly vyjádřit jako změny relativní k SC v každé zkušební destičce. Veškeré údaje musí být vyjádřeny jako střední hodnoty ± 1 směrodatná odchylka (*standard deviation*, SD).
50. Do analýzy údajů by měly být zahrnuty pouze údaje o hormonech z jamek, v nichž byla cytotoxicita nižší než 20 %. Relativní změny by se měly vypočítat takto:

Relativní změna = (koncentrace hormonů v každé jamce) ÷ (střední koncentrace hormonů ve všech jamkách pro kontrolu s rozpouštědlem).

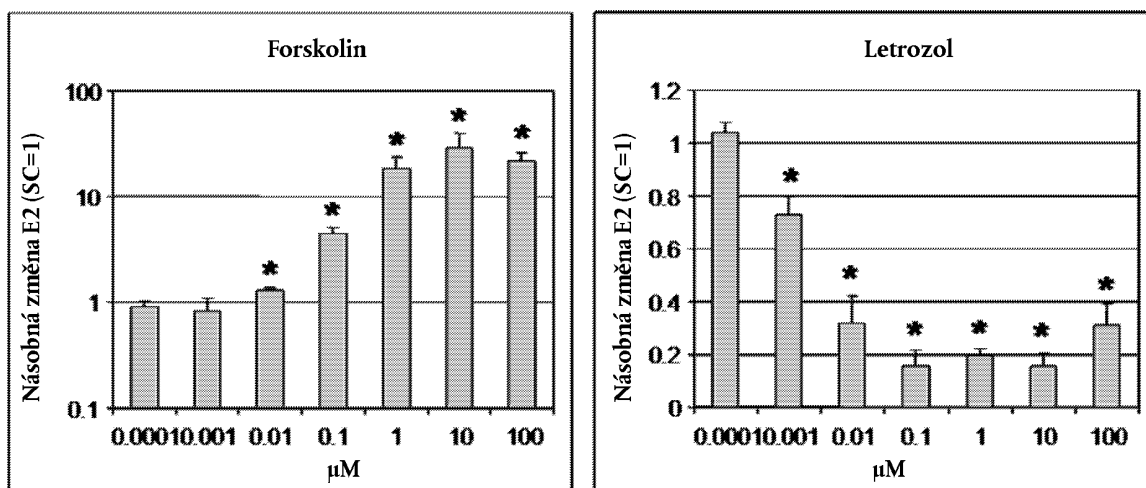
51. Pokud se na základě vizuální prohlídky jamky nebo dle důkazů ze zkoušky životaschopnosti/cytotoxicity popsané v odstavci 42 zdá, že narostl počet buněk, je nutné zdánlivý nárůst ověřit. Je-li nárůst počtu buněk ověřen, mělo by to být uvedeno v závěrečné zprávě.
52. Před provedením statistických analýz by měly být vyhodnoceny předpoklady normality rozdělení a homogenity rozptylu. Normalita by se měla hodnotit pomocí standardních grafů pravděpodobnosti (*probability plot*) nebo jiné vhodné statistické metody (např. Shapiro-Wilkův test). Pokud nejsou údaje (násobné změny) distribuovány normálně, měl by být pro účely aproximace normální distribuce učiněn pokus o jejich transformaci. Pokud jsou údaje distribuovány normálně nebo se přibližují normální distribuci, měly by být rozdíly mezi exponovanými skupinami a kontrolou s rozpouštědlem analyzovány pomocí parametrického testu (např. Dunnettův test), kde *koncentrace* je nezávislá a *reakce* (násobná změna) závislá proměnná. Pokud údaje nejsou normálně distribuovány, měl by se použít neparametrický test (např. Kruskal Wallisův test, Steelův srovnávací „Many-one rank“ test). Rozdíly jsou považovány za významné, když platí $p \leq 0,05$. Statistická hodnocení se provádějí na základě průměrných hodnot pro každou jamku, které představují nezávislé replikované údaje. Předpokládá se, že z důvodu velkých intervalů mezi dávkami v prvním pokusu (škála dekadických logaritmů) v mnoha případech nebude možné popsat jasné vztahy mezi koncentrací a odpovědí, tak aby dvě největší dávky byly v lineární části S křivky. Z tohoto důvodu budou pro první pokus nebo jakékoli jiné soubory údajů, kde nastane tato podmínka (např. tam, kde nelze odhadnout maximální účinnost), použity statistiky pevných proměnných typu I popsané výše.

53. Pokud více než dva údaje leží v lineární části křivky a pokud lze vypočítat maximální účinnost (jak se předpokládá u některých z druhých pokusů, které se provádějí pomocí semilogaritmických intervalů expozičních koncentrací), měl by být pro výpočet účinných koncentrací použit probitový, logitový nebo jiný vhodný regresní model (např. EC50 a EC20).
54. Výsledky by měly být prezentovány v grafickém (sloupcové diagramy vyjadřující střední hodnotu ± 1 SD) a tabulkovém formátu (LOEC/NOEC, směr účinku a síla maximální odpovědi, která je součástí údajů typu dávka–reakce) (viz např. obrázek 3). Posouzení údajů se považuje za platné pouze v případě, že se opírá nejméně o dva nezávisle provedené pokusy. Experiment nebo pokus se považuje za nezávislý, pokud byl proveden v jiný den za pomoci nového souboru roztoků a kontrol. Rozmezí koncentrací použitých v pokusech 2 a 3 (v případě potřeby) lze upravit na základě výsledků pokusu 1 tak, aby bylo lépe definováno rozmezí závislosti dávka–odpověď zahrnující LOEC (viz odstavec 47).

Obrázek 3

Příklad prezentace a hodnocení údajů získaných během zkoušky H295R v grafickém a tabulkovém formátu

Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly od kontroly s rozpouštědlem ($p < 0,05$). LOEC: nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem; max. změna: maximální síla reakce pozorovaná při jakékoli koncentraci ve vztahu k průměrné reakci SC (= 1)



Chemická látka	LOEC	Max. změna
Forskolin	0,01	0,15 násobek
Letrozol	0,001	29 násobek

Postup při interpretaci údajů

55. Má se za to, že zkoušená chemická látka je pozitivní, pokud se násobná indukce statisticky liší ($p \leq 0,05$) od kontroly s rozpouštědlem při dvou sousedních koncentracích nejméně ve dvou nezávislých pokusech (tabulka 7). Má se za to, že zkoušená chemická látka je negativní po dvou nezávislých negativních pokusech nebo při třech pokusech, které zahrnují dva negativní pokusy a jeden dvojznačný nebo pozitivní pokus. Pokud údaje získané při třech nezávislých experimentech nesplňují kritéria rozhodnutí uvedená v tabulce 7, nelze výsledky pokusů interpretovat. Do interpretace výsledků by neměly být zahrnuty výsledky při koncentracích překračujících limity rozpustnosti nebo při cytotoxických koncentracích.

Závěrečná zpráva

56. Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkušební zařízení

- název a adresa zařízení,
- vedoucí studie a další pracovníci a jejich povinnosti v rámci studie,
- data zahájení a ukončení studie.

Zkoušená chemická látka, chemická činidla a kontroly

- totožnost (název, příp. číslo CAS), zdroj, číslo šarže, čistota, dodavatel a charakterizace zkoušené chemické látky, chemických činidel a kontrol,
- fyzikální povaha a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky,
- podmínky uskladnění a metoda a četnost přípravy zkoušených chemických látek, chemických činidel a kontrol,
- stabilita zkoušené chemické látky.

Buňky

- zdroj a typ buněk,
- počet buněčných pasáží (identifikátor buněčné pasáže) buněk použitých při zkoušce,
- popis postupů uchovávání buněčných kultur.

Požadavky před zkouškou (je-li to relevantní)

- popis a výsledky testu chemické interference hormonů,
- popis a výsledky měření účinnosti extrakce hormonů,
- standardní a kalibrační křivky pro všechny analytické zkoušky, které budou provedeny,
- limity detekce pro vybrané analytické zkoušky.

Zkušební podmínky

- složení média,
- koncentrace zkoušené chemické látky,
- hustota buněk (odhadované nebo změřené buněčné koncentrace během 24 hodin a 48 hodin),
- rozpustnost zkoušené chemické látky (limit rozpustnosti, je-li určen),
- inkubační doba a podmínky.

Výsledky zkoušek

- prvotní údaje týkající se jednotlivých jamek pro kontroly a testované látky – každé opakované měření ve formě původních údajů získaných z přístroje použitého k měření produkce hormonů (např. OD, fluorescenční jednotky, DPM atd.),
- prokázání normality rozdělení nebo vysvětlení transformace údajů,
- průměrná odpověď ± 1 SD pro každou měřenou jamku,
- údaje o cytotoxicitě (zkoušené koncentrace, které způsobily cytotoxicitu),
- potvrzení, že byly splněny požadavky kontroly kvality,
- relativní účinek v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem po korekci na cytotoxicitu,
- sloupcový graf ukazující vztah (násobnou změnu) při každé koncentraci, SD a statistickou významnost, jak je uvedeno v odstavcích 49–54.

Interpretace údajů

- uplatnění postupu pro interpretaci údajů na výsledky a diskuse o nálezech.

Diskuse

- Vyplývají ze studie nějaké známky týkající se toho, že by údaje o T/E2 mohly být ovlivněny nepřímými účinky na dráhy gluko- a mineralokortikoidů?

Závěry

LITERATURA

- 1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v dodatku 2 kapitoly B.54 této přílohy.
- 2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Environ. Pharmacol.*, 217, 114–124.
- 3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies, *Env. Techn. Pollut. Res.*, 14, 23–30.
- 4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. K dispozici na internetové adrese [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- 5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- 6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, k dispozici na adrese: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- 7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.* 81, 78–89.
- 8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Environ. Pharmacol.*, 182, 44–54.
- 9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265–272.
- 10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Techn. Poll. Res.*, 17:1137–1148.
- 11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488–5496.
- 12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578–584.
- 13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Techn. Technol.*, 39:2777–2785.
- 14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Techn. Ind. Res.*, 17:1137–1148.
- 15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., McCarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731–737.
- 16) Kapitola B.55 této přílohy: Hersbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.
- 17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222–231.
- 18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.

-
- 19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598–1606.
 - 20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484–492.
-

Dodatek

DEFINICE

CV se rozumí variační koeficient, který je definován jako poměr směrodatné odchylky distribuce k jejímu aritmetickému průměru.

CYP označuje cytochrom P450 monooxygenázy, což je rodina genů a enzymů z nich vypočítaných, které se účastní katalyzace široké škály biochemických reakcí zahrnujících syntézu a metabolismus steroidních hormonů.

Destička pro kontrolu kvality (QC-destička) je 24-jamková destička obsahující dvě koncentrace pozitivních a negativních kontrol pro sledování chování nové dávky buněk nebo pro zajištění pozitivních kontrol pro zkoušku při zkoušení chemických látek.

DPM (*disintegration per minute*) je zkratkou pro rozpad za minutu. Je to počet atomů v daném množství radioaktivního materiálu, u něhož bylo zjištěno, že se rozpadne za jednu minutu.

E2 je 17 β -estradiol, nejdůležitější estrogen v těle savců.

H295R buňky jsou buňky lidského adrenálního karcinomu, které mají fyziologické charakteristiky zonálně nediferencovaných adrenálních buněk lidského plodu a které zajišťují expresi enzymů dráhy steroidogeneze. Lze je získat ze sbírky ATCC.

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

Konfluencí se rozumí pokrytí nebo množství buněk, které je u buněk povoleno nad kultivačním médiem nebo v něm.

Kontrola kvality, zkráceně QC, označuje opatření nezbytná k zajištění platných údajů.

Lineární oblast je interval v rámci standardní křivky pro systém měření hormonů, kde výsledky jsou úměrné koncentraci analytu přítomného ve vzorku.

Mrazicí médium se používá ke zmrazování a uchovávání zmrazených buněk. Obsahuje zásobní médium, BD Nu-sérum a dimethylsulfoxid.

LOQ je zkratkou pro *mez kvantifikace* (*Limit of Quantification*), a je to nejmenší množství chemické látky, které lze odlišit od nepřítomnosti této chemické látky (slepá hodnota) v rámci stanovené meze spolehlivosti. Pro účely této metody je LOQ obvykle definován výrobcem testovacích systémů, není-li specifikován jiným způsobem.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) je zkratkou pro nejmenší koncentraci s pozorovaným účinkem, tedy nejmenší úroveň koncentrace, u níž se reakce na zkoušku ze statistického hlediska liší od reakce na kontrolu rozpouštědla.

NOEC (*No Observed Effect Concentration*) je zkratkou pro koncentraci bez pozorovaných účinků, což je nejvyšší zkoušená koncentrace, kde nebyla zjištěna pozitivní odpověď.

Obohacené médium se skládá ze zásobního média s BD Nu-sérem a prémiovou směsí ITS+, viz dodatek II validační zprávy (4).

Pasáž je číslo udávající počet dělení buněk po zahájení kultivace ze zmrazených zásob. Počáteční pasáž, která byla vytvořena ze zmrazených zásob, nese číslo jedna (1). Buňky, které byly rozděleny jednou, jsou označeny jako pasáž 2 atd.

PBS je Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru.

Pokus je nezávislý experiment, který je charakterizován novým souborem roztoků a kontrol.

Steroidogeneze je syntetická dráha vedoucí od cholesterolu k různým steroidním hormonům. Některé meziprodukty v dráze steroidní syntézy, např. progesteron a testosteron, jsou důležitými hormony samy o sobě, ale slouží také jako prekurzory hormonů dále v syntetické dráze.

T představuje testosteron, jeden ze dvou nejdůležitějších androgenů v těle savců.

Trypsin 1X je zředěný roztok enzymu trypsin, serinové proteázy vyskytující se ve dvanácterníku, používaný k uvolňování buněk z destičky pro kultivaci buněk, viz dodatek III validační zprávy (4).

Zásobní médium je základ pro přípravu dalších roztoků/reagencií. Skládá se ze směsi Dulbeccovy modifikace Eagleova média a Hamovy směsi živin F12 v poměru 1:1 (DMEM/F12) v 15mM pufru HEPES bez fenolové červeně nebo hydrogenuhlčitanu sodného. Hydrogenuhlčitan sodný se přidává jako pufr, viz dodatek II validační zprávy (4).

Zkoušenou chemickou látkou se rozumí jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Zkušební destičkou se rozumí destička, na které jsou buňky H295R vystaveny zkoušeným chemickým látkám. Zkušební destičky obsahují kontrolu s rozpouštědlem a zkoušenou chemickou látkou v sedmi úrovních koncentrace ve třech provedeních.

B.58 ZKOUŠKY GENOVÝCH MUTACÍ U SOMATICKÝCH A ZÁRODEČNÝCH BUNĚK TRANSGENNÍCH HLODAVCŮ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 488 (2013). Zkušební metody EU jsou k dispozici pro širokou škálu *in vitro* testů mutagenity, které jsou schopny odhalit chromozomové a/nebo genové mutace. Existují zkušební metody pro testování *in vivo* (ty detekují chromozomové aberace a neplánovanou syntézu DNA), ale pro genové mutace takové metody dosud nebyly k dispozici. Zkoušky mutací u transgenních hlodavců (*Transgenic Rodent*, TGR) splňují potřebu praktických a obecně dostupných zkoušek *in vivo* pro genové mutace.
2. O zkouškách mutací u TGR existují rozsáhlé přehledové dokumenty (24) (33). Tyto zkoušky používají transgenní potkany a myši, jejichž organismy obsahují velké množství kopií chromozomově integrovaných plazmidových nebo fágových shuttle vektorů. Transgeny obsahují reporterové geny pro zjišťování různých typů mutací indukovaných *in vivo* zkoušenými chemickými látkami.
3. Mutace, k nimž dochází u hlodavců, se získávají pomocí obnovy/odkrytí transgenu a analýzy fenotypu reporterového genu v bakteriálním hostiteli, který postrádá reporterový gen. Zkoušky genových mutací u TGR posuzují mutace indukované u geneticky neutrálních genů znovu získaných v podstatě z jakékoli tkáně hlodavce. Tyto analýzy tudíž obcházejí mnohá ze stávajících omezení spojených se studiem genových mutací *in vivo* u endogenních genů (např. omezení na tkáně vhodné pro analýzu, negativní/pozitivní selekce proti mutacím).
4. Posouzení závažnosti důkazů naznačuje, že transgeny reagují na mutageny podobně jako endogenní geny, zejména pokud se týká detekce substituce párů bází, posunových mutací a malých delecí a insercí (24).
5. Mezinárodní semináře o zkoušení genotoxicity (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) schválily zařazení zkoušek genových mutací u TGR mezi metody zjišťování genových mutací *in vivo* a doporučily postup pro jejich provádění (15) (29). Tato zkušební metoda (B.58) se opírá o tato doporučení. Další analýzu podporující používání tohoto postupu lze najít v (16).
6. Předpokládá se, že v budoucnu bude možné zkombinovat zkoušky genových mutací u TGR se studií toxicity při opakované aplikaci (kapitola B.7 této přílohy). Je však třeba mít další údaje, aby bylo zajištěno, citlivost zkoušek genových mutací u TGR nebude ovlivněna kratším, jednodenním intervalem mezi ukončením aplikace a odběrem vzorků, jak je tomu u studie toxicity s opakovanou aplikací v porovnání s třídním intervalem používaným při zkouškách genových mutací u TGR. Je také nutné mít údaje o tom, že provedení studie s opakovaným podáváním látky nebude negativně ovlivněno použitím transgenního kmene namísto tradičních kmenů hlodavců. Až tyto údaje budou k dispozici, bude tato zkušební metoda aktualizována.
7. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

8. Zkoušky genových mutací u TGR, pro které je k dispozici dostatek údajů, aby mohly být zařazeny v této zkušební metodě, jsou tyto: myš s bakteriofágem *lacZ* (MutaTMMouse); myš s plazmidem *lacZ*, delta myš a potkan *gpt* (*gpt* a *Spi*⁻), myš a potkan *lacI* (Big Blue®), prováděné podle standardních podmínek. Kromě toho lze pro posouzení mutací v modelech Big Blue® a MutaTMMouse použít zkoušku pozitivní selekce *cII*. Mutageneze v modelech TGR se zpravidla posuzuje jako četnost mutací; v případě potřeby však může další informace dodat molekulární analýza mutací (viz odstavec 24).
9. Tyto zkoušky genových mutací *in vivo* u hlodavců jsou při posuzování mutagenního rizika důležité zejména proto, že účinky zjištěné v těchto zkouškách jsou závislé na metabolismu *in vivo*, farmakokinetice, procesech opravy DNA a translézní syntéze DNA, ačkoli ty se mohou u jednotlivých druhů, tkání a typů poškození DNA lišit. Zkouška *in vivo* pro genové mutace je užitečná pro další šetření mutagenního účinku zjištěného systémem *in vitro* a pro následné monitorování výsledků testů pomocí jiných cílových parametrů *in vivo* (24). Vedle toho, že jsou genové mutace příčinným vztahem spojeny se vznikem rakoviny, jsou také významným parametrem pro predikci nezhoubných onemocnění způsobených mutacemi v somatických tkáních (12) (13), jakož i pro onemocnění přenášaná zárodečnými buňkami.

10. Existují-li důkazy o tom, že zkoušená chemická látka nebo relevantní metabolit se nedostanou do žádné z relevantních tkání, není vhodné provádět zkoušku genových mutací u TGR.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Ve zkouškách popsaných v odstavci 8 je cílový gen původně bakteriální nebo bakteriofágový a prostředkem pro znovuzískání genu z genomické DNA hlodavců je začlenění transgenu do bakteriofágu λ nebo plazmidového shuttle vektoru. Proces zahrnuje extrakci genomické DNA ze sledované tkáně hlodavců, zpracování genomické DNA *in vitro* (tj. sbalování vektorů λ nebo ligace a elektroporace plazmidů pro obnovu shuttle vektoru) a následné zjištění mutací v bakteriálních hostitelích za vhodných podmínek. Zkoušky využívají neutrální transgeny, které lze snadno znovu získat z většiny tkání.
12. Základní experiment zkoušky genových mutací u TGR zahrnuje podávání chemické látky hlodavcům po určité časové období. Chemické látky mohou být podávány jakýmkoli vhodným způsobem, včetně implantace (např. zkoušení lékařských přístrojů). Celkové období, během kterého je zvířeti látka podávána, se nazývá doba aplikace. Po aplikaci obvykle následuje období před utracením, během kterého není chemická látka podávána a kdy jsou neopravené léze DNA fixovány do stálých mutací. V literatuře je toto období označováno různě: jako doba manifestace, doba fixace nebo doba exprese; toto období končí odběrem vzorků (15) (29). Po utracení zvířete je genomická DNA izolována ze sledované tkáně (tkání) a vyčištěna.
13. Údaje pro jednu tkáň z jednoho zvířete z více sbalení/ligací jsou obvykle agregovány a četnost mutací je obecně hodnocena pomocí celkového počtu cca 10^5 až 10^7 jednotek tvořících plak nebo kolonii. Při používání metod pozitivní selekce počet jednotek tvořících plak určen pomocí samostatného souboru neselektivních destiček.
14. Metody pozitivního selektivního výběru byly vyvinuty s cílem usnadnit zjišťování mutací v genu *gpt* [myš a potkan *gpt*, fenotyp *gpt*⁻ (20) (22) (28)] a genu *lacZ* [MutaTMMouse nebo myš s plazmidem *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; zatímco mutace genu *lacI* ve zvířatech Big Blue® jsou zjišťovány prostřednictvím neselektivní metody, která identifikuje mutace pomocí tvorby barevných (modrých) plaků. Metodika pozitivní selekce se používá i k zjišťování bodových mutací vznikajících v genu *cII* shuttle vektoru bakteriofágu λ [myš nebo potkan Big Blue® a MutaTM-Mouse (17)] a mutací vyvolaných delecí v genech λ *red* a *gam* [selekce Spi⁻ u delta myši a potkana *gpt* (21) (22) (28)]. Četnost mutací se vypočítá vydělením počtu plaků/plazmidů obsahujících mutace v transgenu celkovým počtem plaků/plazmidů získaných z téhož vzorku DNA. Ve studiích genových mutací TGR je četnost mutací výsledným parametrem. Četnost mutací lze navíc určit jako frakci buněk nesoucích nezávislé mutace; pro tento výpočet je požadována korekce pro klonální expanzisekvenováním obnovených mutací (24).
15. Mutace hodnocené v zkouškách bodových mutací *lacI*, *lacZ*, *cII* a *gpt* jsou tvořeny primárně mutacemi substitucí páru bází, posunovými mutacemi a malými insercemi/delecemi. Relativní podíl těchto typů mutací mezi spontánními mutacemi je podobný podílu, který je pozorován u endogenního genu *Hprt*. Velké delecce jsou zjišťovány pouze u selekce Spi⁻ genu a zkoušek plazmidů *lacZ* (24). Předmětem zájmu jsou zde mutace *in vivo*, které vznikají u myši nebo potkanů. Mutace *in vitro* a *ex vivo*, které mohou vzniknout během znovuzískávání, replikace nebo opravy fágu/plazmidu, jsou relativně vzácné a v některých systémech mohou být speciálně identifikovány nebo vyloučeny systémem pozitivní selekce u bakteriálního hostitele.

POPIS METODY

Přípravy

Volba druhu zvířat

16. V současné době je k dispozici široká paleta modelů pro zjištění genových mutací u transgenních myši a tyto systémy se používají častěji než modely transgenních potkanů. Pokud je potkan jasně vhodnějším modelem než myš (např. pokud je při šetření mechanismu karcinogeneze pozorován nádor pouze u potkanů, pro korelaci se studií toxicity u potkanů, nebo pokud je o metabolismu potkanů známo, že je podobnější lidskému metabolismu), mělo by být zváženo použití modelů transgenních potkanů.

Podmínky chovu a krmení

17. Teplota v místnosti s pokusnými zvířaty by měla být v ideálním případě 22 °C ($\pm$ 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by, kromě doby úklidu místnosti, neměla přesáhnout 70 %, cílem by mělo být dosažení relativní hodnoty 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé s každodenním střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní potravu a k pití by mělo být k dispozici neomezené množství vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Zvířata by měla být umístěna v klecích v malých skupinách (maximálně pět zvířat) stejného pohlaví, pokud se neočekává agresivní chování. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

18. Zdravá mladá pohlavně zralá dospělá zvířata (8–12 týdnů stará na začátku aplikace) jsou náhodně rozdělena do kontrolních a experimentálních skupin. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit $\pm$ 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Příprava dávek

19. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalně zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Měly by být použity čerstvě připravené aplikační formy zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky*Rozpouštědlo/vehikulum*

20. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula.

Pozitivní kontroly

21. Měly by se zpravidla používat zvířata pro současnou pozitivní kontrolu. Avšak u laboratoří, které prokázaly způsobilost (viz odstavec 23) a tyto zkoušky používají běžně, lze do každé studie pro potvrzení úspěšného provedení metody zařadit DNA zvířat, která byla součástí předchozích pozitivních kontrol. Vzorky DNA z předchozích experimentů by měly být pořízeny ze stejných druhů a požadovaných tkání a měly by být náležitě skladovány (viz odstavec 36). Pokud se využívají souběžné pozitivní kontroly, není nutné podávat je stejným způsobem jako zkoušenou chemickou látku. O těchto pozitivních kontrolách by však mělo být známo, že indukují mutace v jedné nebo více sledovaných tkáních pro zkoušenou chemickou látku. Dávky pozitivních kontrolních chemických látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly slabé nebo mírné účinky, které nejlépe dokládají správné provedení a citlivost zkoušky. Příklady pozitivních kontrolních chemických látek a některé z jejich cílových tkání jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady pozitivních kontrolních látek a některé z jejich cílových tkání

Chemická látka a číslo CAS	Název a číslo EINECS	Charakteristika	Cílová tkáň pro mutace	
			Potkan	Myš
1-ethyl-1-nitrosomočovina [č. CAS 759-73-9]	1-ethyl-1-nitrosomočovina [212-072-2]	Přímo působící mutagen	Játra, plíce	Kostní dřeň, tračník, epitel tračníku, střevo, játra, plíce, slezina, ledvina, buňky zrnité membrány na vaječnících, samčí zárodečné buňky

Chemická látka a číslo CAS	Název a číslo EINECS	Charakteristika	Cílová tkáň pro mutace	
			Potkan	Myš
Ethyl-karbamát (uretan) [č. CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, ale produkuje pouze slabé účinky		Kostní dřeň, předžaludek, tenké střevo, játra, plíce, slezina
2,4-diaminotoluen [č. CAS 95-80-7]	4-methyl-1,3-fenylendiamin [202-453-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, také pozitivní při zkoušce S_{pi}	Játra	Játra
Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]	Benzo[def]chrysen [200-028-5]	Mutagen, vyžaduje metabolismus	Játra, předstěra,	Kostní dřeň, prsa, tračník, předžaludek, žláznatý žaludek, srdce, játra, plíce, samčí zárodečné buňky

Negativní kontroly

22. Součástí každého odběru vzorků by měly být negativní kontroly s aplikací pouze rozpouštědla nebo vehikula, které jsou jinak prováděny stejně jako u experimentálních skupin. Nejsou-li k dispozici dosavadní nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky, měly by být do každého odběru vzorků zahrnuty i kontroly bez aplikace pro posouzení účinku vehikula.

Ověření způsobilosti laboratoře

23. Způsobilost pro tyto zkoušky by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat očekávané výsledky ze zveřejněných údajů (24) týkajících se: 1) četností mutací s chemickými látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s chemickými látkami uvedenými v tabulce 1, nemutagenů a kontrol vehikula; 2) znovuzískání transgenů z genomické DNA (např. účinnost sbalování).

Sekvenování mutací

24. Při použití výsledku zkoušky pro legislativní účely není vyžadováno sekvenování DNA mutací, obzvláště pak tam, kde bylo dosaženo jasně pozitivního nebo negativního výsledku. Údaje o sekvenování však mohou být užitečné při pozorování rozdílů mezi jedinci. V těchto případech lze sekvenování použít k vyloučení možnosti vzniku jack-potů nebo klonálních událostí identifikací podílu jedinečných mutací z konkrétní tkáně. Sekvenování přibližně 10 mutací na tkáň a zvíře by mělo být dostatečné pro jednoduché určení, zda klonální mutace přispívají k četnosti mutací. Sekvenování až 25 mutací bude možná nutné pro matematickou korekci četnosti mutací na klonalitu. O sekvenování mutací lze také uvažovat při zjištění malého nárůstu četnosti mutací (tj. mírné překročení hodnot kontrol bez aplikace). Rozdíly ve spektru mutací mezi koloniemi mutací ze zvířat, jimž je a není podávána látka, mohou podpořit rozhodnutí o mutagenním účinku (29). Spektra mutací mohou být rovněž užitečná pro formulování mechanistických hypotéz. Má-li být sekvenování zahrnuto do provedení studie, je třeba věnovat speciální pozornost plánování takových studií, zvláště s ohledem na počet mutací sekvenovaných na jeden vzorek, aby bylo možné dosáhnout adekvátní síly experimentu vzhledem k použitému statistickému modelu (viz odstavec 43).

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

25. Počet zvířat ve skupině by měl být stanoven předem tak, aby stačil k dosažení statistické síly nezbytné pro zjištění nejméně zdvojnásobení četnosti mutací. V jedné skupině bude minimálně pět zvířat. Pokud ale bude statistická síla nedostatečná, počet zvířat by měl být dle potřeby zvýšen. Zpravidla by se měli používat samci. V některých případech může být odůvodněné používat ke zkouškám pouze samice, například při zkoušení humánních léků pro ženy nebo při zkoumání ženského metabolismu. Pokud jsou mezi pohlavími z hlediska toxicity nebo metabolismu výrazné rozdíly, budou požadováni samci i samice.

Doba podávání

26. Na základě pozorování, že se mutace s každou aplikací akumulují, je nutný režim opakované každodenní aplikace po dobu 28 dnů. To je obecně považováno za přijatelné pro produkci dostatečné akumulace mutací slabými mutageny a pro poskytnutí doby expozice vhodné pro zjištění mutací v pomalu rostoucích orgánech. Pro některá hodnocení mohou být vhodné alternativní režimy aplikace a tyto alternativní harmonogramy podávání dávek by měly být vědecky odůvodněny v plánu studie. Aplikace by neměla být kratší než doba požadovaná pro úplnou indukci všech příslušných metabolizujících enzymů a kratší aplikace mohou vyžadovat několik intervalů pro odběr vzorků, přizpůsobených pro orgány s různou rychlostí růstu. Veškeré dostupné informace (např. o obecné toxicitě nebo metabolismu a farmakokinetice) by každopádně měly být použity při odůvodňování plánu studie, zejména pokud se odchyluje od výše uvedených standardních doporučení. Ačkoli se může zvýšit citlivost, doba aplikace delší než osm týdnů by měla být jasně vysvětlena a odůvodněna, jelikož dlouhé doby aplikace mohou způsobit zjevný nárůst četnosti mutací prostřednictvím klonální expanze (29).

Dávkování

27. Dávkování by mělo vycházet z výsledků studie pro stanovení rozmezí dávek, která měří obecnou toxicitu a která byla provedena se stejným způsobem expozice, nebo z výsledků starších studií subakutní toxicity. Při určování rozmezí dávek lze použít netransgenní zvířata stejného kmene hlodavců. V hlavní zkoušce by s cílem získat informace o závislosti účinku na dávce měla úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu (viz odstavec 22) a minimálně tři, náležitě rozvržené úrovně dávek, ledaže byla použita limitní dávka (viz odstavec 28). Nejvyšší dávka by měla být maximální tolerovaná dávka (MTD). MTD je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly podle očekávání při stejném režimu dávkování k letalitě. Chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně. Použité dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně nulovou toxicitou.

Limitní zkouška

28. Pokud experimenty pro určení rozmezí dávek nebo stávající údaje získané u příbuzných kmenů hlodavců naznačují, že aplikace limitní dávky (viz níže) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky, a pokud by genotoxicita nebyla očekávána na základě údajů o strukturně příbuzných chemických látkách, nemusí být úplná studie se třemi úrovněmi dávek pokládána za nutnou. Pro dobu podávání v délce 28 dnů (tj. 28 každodenních aplikací) je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den. Pro dobu podávání v délce maximálně 14 dnů je limitní dávka 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den (harmonogramy podávání dávek odlišné od 28 každodenních aplikací by měly být vědecky odůvodněny v plánu studie, viz odstavec 26).

Podávání dávek

29. Zkoušená chemická látka se obvykle podává nitrožaludečně žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Z tohoto důvodu mohou být přijatelné i jiné způsoby expozice (například v pitné vodě, podkožně, nitrožilně, místně, inhalací, intratracheálně, stravou nebo implantací), pokud je bude možné odůvodnit. Intraperitoneální aplikace se nedoporučuje, protože to není fyziologicky relevantní způsob expozice člověka. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití objemů větších než tento by mělo být odůvodněno. S výjimkou dráždivých nebo žíravých chemických látek, které ve vyšších koncentracích mají obvykle navýšený účinek, měla by být variabilita aplikovaného objemu minimalizována tím, že aplikované koncentrace se nastaví tak, aby aplikovaný objem byl konstantní při všech úrovních dávek.

Doba odběru vzorků

Somatické buňky

30. Doba odběru vzorků je kritická proměnná, protože je určována dobou potřebnou pro fixaci mutací. Toto období závisí na příslušné tkáni a zdá se, že souvisí s dobou obratu buněčné populace, přičemž kostní dřeň a střevo reagují rychle a játra jsou mnohem pomalejší. Vhodným kompromisem pro měření četností mutací v rychle

a pomalu se množících tkáních je 28 po sobě jdoucích každodenních aplikací (jak je uvedeno v odstavci 26) a odběr vzorků tři dny po konečné aplikaci, ačkoli za těchto podmínek se maximální četnost mutací v pomalu rostoucích tkáních nemusí projevit. Pokud jsou pomalu rostoucí tkáně obzvláště důležité, pak bude možná vhodnější pozdější doba odběru vzorků, a to 28 dní následujících po 28denní době podávání. V takových případech by pozdější doba odběru vzorků nahradila třídenní dobu odběru a musela by být vědecky odůvodněna.

Zárodečné buňky

31. Zkoušky TGR jsou velmi vhodné pro studii indukce genových mutací v samčích zárodečných buňkách (7) (8) (27), kde je dobře definováno načasování a kinetika spermatogeneze (27). Nízké počty vajíček dostupných pro analýzu, dokonce i po superovulaci, a skutečnost, že v oocytu neprobíhá žádná syntéza DNA, vylučují detekci mutací v samčích zárodečných buňkách pomocí transgenních zkoušek (31).
32. Doby odběru vzorků pro samčí zárodečné buňky by měly být zvoleny tak, aby byl pokryt celý rozsah exponovaných buněčných typů po celou dobu vývoje zárodečných buněk a pro buňky ve stadiu zachyceném dobou odběru byla zajištěna dostatečná expozice. Progrese vývoje zárodečných buněk ze spermatogonálních kmenových buněk ve zralou spermii, která se dostane do chámovodu/ocasu nadvarletetrvá ~49 dnů u myši (36) a ~70 dnů u potkanů (34) (35). Po 28denní expozici s následnou třídenní dobou odběru vzorků budou akumulované spermie odebrané z chámovodu/ocasu nadvarlete (7)(8) představovat populaci buněk, které byly předmětem expozice přibližně během druhé poloviny spermatogeneze, která zahrnuje meiotické a postmeiotické období, nikoli však spermatogonální období nebo období kmenových buněk. Pro adekvátní odběr vzorků buněk z chámovodu/ocasu nadvarlete, které byly během období expozice spermatogonálními kmenovými buňkami, je vyžadována další doba odběru vzorků v minimální délce sedmi týdnů (myši) nebo deseti týdnů (potkani) po ukončení aplikace.
33. Buňky vypuzené ze semenných tubulů po režimu 28 + 3 dny zahrnují smíšenou populaci obohacenou pro všechna stadia vývoje zárodečných buněk (7) (8). Odběr vzorků těchto buněk pro detekci genových mutací nezajišťuje tak přesné posouzení stadií, v nichž jsou indukovány mutace zárodečných buněk, jakého lze dosáhnout při odběru vzorků spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete (z tubulů se totiž odebírají vzorky celé řady typů zárodečných buněk a tato buněčná populace bude kontaminována určitými somatickými buňkami). Odběr vzorku buněk ze semenných tubulů vedle spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete po režimu odběru 28 + 3 dny by ale zajistil určité pokrytí buněk exponovaných ve většině fází vývoje zárodečných buněk a může být užitečný pro zjišťování určitých mutagenů zárodečných buněk.

Pozorování

34. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být vážena nejméně jednou týdně a při utracení. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utrácena před uplynutím doby zkoušky (23).

Odběr tkání

35. Mělo by být jasně definováno odůvodnění odběru tkání. Jelikož lze studovat indukci mutací v podstatě v jakékoli tkáni, výběr tkání, které budou odebrány, by se měl opírat o důvody, k jakému účelu má být studie provedena, a o jakékoli stávající údaje o mutagenitě, karcinogenitě nebo toxicitě týkající se šetřené chemické látky. K důležitým zvažovaným faktorům by měl patřit způsob podání (na základě pravděpodobných způsobů expozice člověka), předpokládaná distribuce látky v tkáních a možný mechanismus působení. Při absenci jakýchkoli základních informací by mělo být odebráno několik somatických tkání, které mohou být zajímavé. Ty by měly reprezentovat rychle rostoucí a pomalu rostoucí tkáně a tkáně prvního kontaktu. Kromě toho by pro případ, že bude v budoucnosti požadována analýza mutagenity zárodečných buněk, měly být ze semenných tubulů (viz odstavce 32 a 33) odebrány spermie z chámovodu/ocasu nadvarlat a vyvíjející se zárodečné buňky. Měla by být zjištěna hmotnost orgánů a v případě větších orgánů by měly být odběry prováděny vždy ze stejného místa u všech zvířat.

Ukladnění tkání a DNA

36. Tkáně (nebo tkáňové homogenáty) by se měly skladovat při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší a pro izolaci DNA by se měly použít do pěti let. Izolovaná DNA uskladněná v chladničce při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vhodném pufru by se měla využít pro analýzu mutací optimálně do jednoho roku.

Výběr tkání pro analýzu mutací

37. Výběr tkání by měl vycházet z úvah jako: 1) způsob podání nebo místo prvního kontaktu (např. žláznatý žaludek, dochází-li k orální aplikaci, plíce, probíhá-li aplikace formou inhalace, nebo kůže, pokud byla použita místní aplikace); a 2) farmakokinetické parametry pozorované ve studiích obecné toxikologie, které ukazují na distribuci ve tkáních, retenci nebo akumulaci nebo cílové orgány pro toxicitu. Pokud jsou studie prováděny s cílem navázat na studie karcinogenity, měly by být zváženy cílové tkáně pro karcinogenitu. Výběr tkání pro analýzu by měl maximalizovat zjišťování účinků chemických látek, které jsou přímo působícími mutageny *in vitro*, které jsou rychle metabolizované, vysoce reaktivní nebo nedostatečně absorbované, nebo ty, pro které je cílová tkáň určena způsobem aplikace (6).
38. Nejsou-li k dispozici základní informace, a s přihlédnutím k místu kontaktu z důvodu způsobu aplikace by měla být mutagenita detekována v játrech a nejméně jedné rychle se dělící tkáni (např. žláznatý žaludek nebo kostní dřeň). Ve většině případů lze výše uvedených požadavků dosáhnout analýzou dvou pečlivě vybraných tkání, avšak někdy budou zapotřebí tři nebo více tkání. Existují-li důvody specifického zájmu o účinky na zárodečné buňky, včetně pozitivních výsledků získaných v somatických buňkách, pak měly být mutace zjišťovány i v zárodečných buňkách.

Metody měření

39. Pro doporučené transgenní modely jsou k dispozici standardní laboratorní nebo publikované metody pro zjišťování mutací: lambda bakteriofág a plazmid *lacZ* (30), myš *lacI* (2) (18), delta myš *gpt* (22), delta potkan *gpt* (28), *dII* (17). Modifikace by měly být odůvodněny a náležitě zdokumentovány. Lze agregovat a k dosažení vhodného počtu plaků nebo kolonií použít údaje z několika sbalení. Potřeba velkého počtu sbalování pro dosažení vhodného počtu plaků může být známkou nízké kvality DNA. V takových případech by údaje měly být brány v úvahu obezřetně, protože mohou být nespolehlivé. Optimální celkový počet plaků nebo kolonií na jeden vzorek DNA je upravován podle statistické pravděpodobnosti zjištění dostatečných počtů mutací při dané spontánní četnosti mutací. Obecně je požadováno minimálně 125 000 až 300 000 plaků, pokud spontánní četnost mutací je v řádu 3×10^{-5} (15). U zkoušky Big Blue® *lacI* je důležité prokázat, že celý rozsah barevných fenotypů mutací lze zjistit zahrnutím příslušných barevných kontrol souběžných s každým nanesením. Tkáně a výsledné vzorky (položky) by se měly zpracovávat a analyzovat pomocí blokového přístupu, kde jsou položky z kontrolní skupiny vehikulum/rozpuštědlo, ze skupiny pozitivní kontroly (je-li použita) nebo DNA pozitivní kontroly (je-li to relevantní) a z každé experimentální skupiny zpracovány společně.

ÚDAJE A ZPRÁVY

Zpracování výsledků

40. Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Protokol by měl obsahovat celkový počet jednotek tvořících plak (pfu) nebo jednotek tvořících kolonii (cfu), počet mutací a četnost mutací pro každou tkáň z každého zvířete. Pokud existuje více reakcí sbalování (*packaging/rescue reactions*), měl by být dokumentován počet reakcí na jeden vzorek DNA. Údaje o každé jednotlivé reakci by měly být archivovány, ve zprávě stačí uvádět pouze celkové počty pfu nebo cfu. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických známkách podle odstavce 34. Jakékoli výsledky sekvenování by měly být prezentovány pro každou analyzovanou mutaci a měly by být zobrazeny výsledné výpočty četnosti mutací pro každé zvíře a tkáň.

Statistické vyhodnocení a interpretace výsledků

41. Existuje několik kritérií pro určení pozitivního výsledku, jako je nárůst četnosti mutací v závislosti na dávce nebo jasný nárůst četnosti mutací v jedné exponované skupině v porovnání s kontrolní skupinou (rozpuštědlo/vehikulum). Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odpovědi, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny. Prvotní by měla být biologická relevance výsledků, vhodné statistické metody mohou být použity jako pomocné při hodnocení výsledků zkoušek (4) (14) (15) (25) (26). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

42. Zkoušená chemická látka, pro kterou výsledky nesplňují výše uvedená kritéria v žádné tkáni, je v této zkoušce považována za nemutagenní. Pro potvrzení biologického významu negativního výsledku by měla být prokázána expozice tkáně.
43. Pro výsledky získané sekvenováním DNA je k dispozici celá řada statistických přístupů, které jsou nápomocny při interpretaci výsledků (1) (5) (9) (19).
44. Při hodnocení biologického významu reakce může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (32).

Závěrečná zpráva

45. Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka:

- identifikační údaje a číslo CAS, je-li známo,
- zdroj, číslo šarže, je-li k dispozici,
- skupenství a čistota,
- fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provedení studie,
- stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,
- příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,
- analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace).

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,
- individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,
- údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,
- podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,
- metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,
- skutečná dávka (mg/kg tělesné hmotnosti na den) vypočítaná z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě/pitné vodě (ppm) a ze spotřeby, je-li to relevantní,
- podrobnosti o jakosti krmení a vody,
- podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

- způsob utracení,
- postupy izolace a uchovávání tkání,
- metody izolace genomické DNA hlodavců, získání transgenu z genomické DNA a přenos transgenní DNA do bakteriálního hostitele,
- zdroje a čísla šarží všech buněk, sad a chemických činidel (je-li to relevantní),
- metody počítání mutací,
- metody molekulární analýzy mutací a použití při korekci pro klonalitu a/nebo výpočet četností mutací, jsou-li použitelné.

Výsledky:

- stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,
- tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení,
- pro každou tkáň/zvíře počet mutací, počet hodnocených plaků nebo kolonií, četnost mutací,
- pro každou tkáň/skupinu zvířat počet reakcí sbalování na jeden vzorek DNA, celkový počet mutací, střední četnost mutací, směrodatná odchylka,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- pro každou tkáň/zvíře počet nezávislých mutací a střední četnost mutací, pokud byla provedena molekulární analýza mutací,
- souběžné a dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole (nebo nesouběžné pozitivní kontrole DNA),
- analytická stanovení, jsou-li k dispozici (např. koncentrace DNA použité při sbalování, údaje o sekvenování DNA),
- použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

- 1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391–396.
- 2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.
- 3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659.
- 4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.
- 5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405–413.
- 6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.
- 7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Proc. Acad. Sci. Techn. USA*, 92: 7485–7489.

- 8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197–212.
- 9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.
- 10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', *Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 86(20): 7971–7975.
- 11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- 12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.
- 13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.
- 14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™-Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.
- 15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253–259.
- 16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.
- 17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 93(17): 9073–9078.
- 18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.
- 19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772–778.
- 20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.
- 21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi – Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.
- 22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.
- 23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- 25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.
- 26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation Res.*, 388(2–3): 249–289.
- 27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation Res.*, 598: 164–193.

- 28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71–78.
 - 29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141–151.
 - 30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, s. 391–410.
 - 31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1–2): 117–123.
 - 32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - 33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, No 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 - 34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal', *Physiol. Rev.* 52: 198–236.
 - 35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.
 - 36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25–36.
-

Dodatek

DEFINICE

Bodová mutace: obecný výraz pro mutaci postihující pouze malou sekvenci DNA včetně malých insercí, delecí a substitucí základního páru.

Delece: mutace, ve které genom ztratil jeden nebo více (po sobě jdoucích) nukleotidů.

Doba odběru vzorků: konec období, před utrácením, během kterého chemická látka není podávána a během kterého jsou nezpracované léze DNA fixovány do stálých mutací.

Doba podávání: celková doba, během níž jsou zvířeti podávány dávky.

Elektroporace: aplikace elektrických impulzů pro zvýšení propustnosti buněčných membrán.

Endogenní gen: vlastní gen genomu.

Extrabinomické rozdělení: větší variabilita při opakovaných odhadech podílu populace, než by se čekalo, pokud by populace měla binomické rozdělení.

Chemická látka: látka nebo směs.

Inserce: doplnění jednoho nebo více párů bází do sekvence DNA.

Jackpot: velký počet mutací, které vznikly klonální expanzí z jedné mutace.

Jednotka tvořící kolonii (cfu): míra počtu životaschopných bakterií.

Jednotka tvořící plak (pfu): míra počtu životaschopných bakteriofágů.

Kapsida: bílkovinné pouzdro, které obklopuje virovou částici.

Klonální expanze: produkce mnoha buněk z jedné (mutující) buňky.

Konkatemer: dlouhá spojitá biomolekula složená z mnoha identických kopií spojených do série.

Ligace: kovalentní vazba dvou konců molekul DNA pomocí ligázy DNA.

Místo cos: 12nukleotidový segment jednořetězcové DNA, který se vyskytuje na obou koncích dvouřetězcového genomu bakteriofágu lambda.

Mitogen: chemická látka, která stimuluje buňku k zahájení buněčného dělení, navozuje mitózu (tj. dělení buněk).

Neutrální gen: gen, který není dotčen tlaky pozitivní nebo negativní selekce.

Posunová mutace: genetická mutace způsobená insercemi nebo delecemi určitého počtu nukleotidů, již nelze rovnoměrně dělit třemi v rámci sekvence DNA, která udává kódy pro bílkovinu/peptid.

Pozitivní selekce: metoda, díky níž přežívají pouze mutace.

Reporterový gen: gen, jehož mutace se snadno zjišťuje.

Sbalování (packaging): syntéza infekčních částic fágu z přípravy bílkovin kapsidy a konce fágu a konkatemeru molekul DNA fágu. Obvykle se používá ke sbalení DNA naklonované na lambda vektor (oddělený místy cos) do infekčních částic lambda.

Shuttle vektor: vektor sestavený tak, že se může množit ve dvou různých hostitelských druzích; v souladu s tím lze DNA vloženou do shuttle vektoru testovat nebo vmanipulovat do dvou různých typů buněk nebo dvou různých organismů.

Substituce páru bází: typ mutace, který způsobuje nahrazení jedné nukleotidové báze DNA jinou nukleotidovou bází DNA.

Transgenní: patřící organismu, týkající se organismu nebo organismus, jehož genom byl změněn transferem genu nebo genů z jiných druhů.

Účinnost sbalování: účinnost, se kterou jsou sbalené bakteriofágy znovu zachycovány v hostitelských bakteriích.

Velké delece: delece v DNA o více než několika tisících bází (které se účinně zjistí při selekci Spi^- a při zkouškách plazmidu lacZ).

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.“
