

Úradný vestník

Európskej únie

L 247



Slovenské vydanie

Právne predpisy

Zväzok 57

21. augusta 2014

Obsah

II *Nelegislatívne akty*

NARIADENIA

- ★ **Nariadenie Komisie (EÚ) č. 900/2014 z 15. júla 2014, ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení nariadenie (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) ⁽¹⁾ 1**

⁽¹⁾ Text s významom pre EHP

SK

Akty, ktoré sú vytlačené obyčajným písmom, sa týkajú každodennej organizácie poľnohospodárskych záležitostí a sú spravidla platné len obmedzený čas.

Názvy všetkých ostatných aktov sú vytlačené tučným písmom a je pred nimi hviezdička.

II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 900/2014

z 15. júla 2014,

ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení nariadenie (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 13 ods. 2,

keďže:

- (1) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 ⁽²⁾ obsahuje testovacie metódy na určovanie fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity chemikálií, ktoré sa majú používať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006.
- (2) Nariadenie (ES) č. 440/2008 je nevyhnutné aktualizovať tak, aby sa doňho čo najskôr zahrnuli nové a aktualizované testovacie metódy, ktoré nedávno prijala OECD, a tým sa zohľadnil technický pokrok a zaručilo zníženie počtu zvierat používaných na pokusné účely v súlade so smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ ⁽³⁾. Tento návrh bol prekonzultovaný so zainteresovanými stranami.
- (3) Spomínané prispôsobenie technickému pokroku zahŕňa šesť nových testovacích metód na určovanie toxicity a iných zdravotných účinkov vrátane štúdie vývojovej neurotoxicity, rozšírenej jednogenetkej štúdie reprodukčnej toxicity, transgéennej *in vivo* skúšky génovej mutácie hlodavcov, *in vitro* testu na posúdenie účinkov syntézy steroidných hormónov, ako aj dvoch metód *in vivo* na posúdenie estrogénnych a (anti)androgénnych účinkov.
- (4) Nariadenie (ES) č. 440/2008 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.
- (5) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného podľa článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Nariadenie Rady (ES) č. 440/2008 z 30. mája 2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH), (Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 15. júla 2014

Za Komisiu
predseda
José Manuel BARROSO

PRÍLOHA

Príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa mení takto:

Vkladajú sa kapitoly B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 a B.58:

„B.53. ŠTÚDIA VÝVOJOVEJ NEUROTOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 426 (2007). V júni 1995 v Kodani diskutovala pracovná skupina OECD pre reprodukciu a vývojovú toxicitu o potrebe aktualizovať existujúce usmernenia OECD na vykonávanie testov reprodukcie a vývojovej toxicity a o vypracovaní nových usmernení k sledovaným parametrom, ktoré zatiaľ nie sú zahrnuté (1). Pracovná skupina odporučila, aby sa usmernenia na vykonávanie testov vývojovej neurotoxicity vypracovali na základe usmernení US EPA, ktoré boli medzičasom revidované (2). V júni 1996 sa v Kodani uskutočnilo druhé konzultačné stretnutie s cieľom poskytnúť sekretariátu prehľad nových usmernení na vykonávanie testov vývojovej neurotoxicity vrátane hlavných prvkov, napr. podrobností týkajúcich sa výberu druhov zvierat, obdobia dávkovania, obdobia testovania, sledovaných parametrov, ktoré sa majú posudzovať, a kritérií pre hodnotenie výsledkov. Usmernenia USA k posudzovaniu rizika neurotoxicity boli uverejnené v roku 1998 (3). V októbri 2000 sa konalo konzultačné stretnutie odborníkov OECD a v nadväznosti naň seminár Inštitútu ILSI pre vedecké riziká (ILSI Risk Science Institute) a v roku 2005 konzultačné stretnutie odborníkov v Tokiu. Tieto stretnutia sa uskutočnili s cieľom prediskutovať vedecké a technické otázky týkajúce sa súčasných usmernení na vykonávanie testov a odporúčania zo stretnutí (4)(5)(6)(7) sa zohľadnili pri vypracúvaní tejto testovacej metódy. Ďalšie informácie o realizácii, interpretácii a použitej terminológii v súvislosti s touto testovacou metódou sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD č. 43 o „testovaní a hodnotení reprodukčnej toxicity“ (8) a v usmerňovacom dokumente č. 20 o „testovaní neurotoxicity“ (9).

ÚVODNÉ ÚVAHY

2. O mnohých chemikáliách je známe, že majú vývojové neurotoxické účinky na ľudí a iné živočíšne druhy (10)(11)(12)(13). Na posúdenie a hodnotenie toxických vlastností chemikálie môže byť potrebné určiť potenciál vývojovej neurotoxicity. Štúdie vývojovej neurotoxicity sú určené na získanie údajov, medzi ktoré patrí aj charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou, o potenciálnych funkčných a morfológických účinkoch na vyvíjajúcu sa nervovú sústavu mláďat, ktoré môžu súvisieť s expozíciou v utere a v ranom vývojovom štádiu.
3. Štúdiu vývojovej neurotoxicity možno vykonať ako samostatnú štúdiu, zahrnutú do štúdie reprodukčnej toxicity a/alebo štúdie neurotoxicity u dospelých jedincov (napr. testovacie metódy B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) alebo ju priložiť k štúdii prenatálnej vývojovej toxicity (napr. testovacia metóda B.31 (17)). Ak je štúdia vývojovej neurotoxicity zahrnutá do inej štúdie, alebo je k nej priložená, je nevyhnutné zachovať integritu oboch typov štúdií. Všetky testy by mali byť v súlade s príslušnými právnymi predpismi alebo vládnymi a inštitucionálnymi usmerneniami pre používanie laboratórnych zvierat vo výskume (napr. 18).
4. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii pred uskutočnením štúdie. Tieto informácie zahŕňajú identitu a štruktúru chemikálie, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných in vitro alebo in vivo testov toxicity s chemikáliou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách a predpokladané použitie(-ia) chemikálie. Tieto informácie sú potrebné, aby sa zainteresované strany presvedčili, že test má význam pre ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere vhodnej počiatočnej dávky.

PRINCÍP TESTU

5. Testovaná chemikália sa podáva zvieratám počas gravidity a laktácie. Účelom testovania matiek je posúdiť účinky u gravidných samíc a samíc v laktácii, pričom tieto testy môžu priniesť aj komparatívne informácie (matky v porovnaní s mláďatami). Mláďatá sa na účely hodnotenia neurotoxicity vyberú z vrhov náhodne. Hodnotenie pozostáva z pozorovaní s cieľom odhaliť makroskopické neurologické abnormality a poruchy správania vrátane posúdenia fyzického vývinu, behaviorálnej ontogenézy, motorickej aktivity, motorických a zmyslových funkcií, učenia a pamäte, ako aj posúdenia hmotnosti mozgu a neuropatológie počas postnatálneho vývinu a dospelosti.

6. Ak sa testovacia metóda vykonáva ako samostatná štúdia, možno ďalšie dostupné zvieratá v každej skupine použiť na špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy, ktoré môžu doplniť údaje získané z vyšetrení odporúčaných podľa tejto testovacej metódy (16)(19)(20)(21). Dodatočné postupy môžu byť mimoriadne užitočné, keď empirické pozorovania, očakávané účinky alebo mechanizmus/pôsobenie indikujú špecifický typ neurotoxicity. Tieto dodatočné postupy možno použiť v prípade matiek, ako aj mláďat. Okrem toho možno použiť aj postupy ex vivo alebo in vitro, pokiaľ tieto postupy nenarúšajú integritu postupov in vivo.

PRÍPRAVY NA TEST

Výber druhov zvierat

7. Uprednostňovaným druhom zvierat sú potkany, ak je to vhodné, môžu sa použiť aj iné druhy. Majte však na pamäti, že gestačné a postnatálne dni uvedené v tejto testovacej metóde sú špecifické pre bežne používané kmene potkanov a ak sa použije iný druh alebo menej bežný kmeň, mali by sa zvoliť porovnateľné dni. Použitie iného druhu je potrebné odôvodniť na základe toxikologických, farmakokinetických a/alebo iných údajov. V odôvodnení sa uvedie dostupnosť druhovo špecifických postnatálnych neurobehaviorálnych a neuropatologických hodnotení. Ak sa predtým uskutočnil test, ktorý viedol k obavám, mal by sa zvážiť druh/kmeň, ktorý tieto obavy vyvolal. Vzhľadom na rozdielne vlastnosti rôznych kmeňov potkanov by mali byť k dispozícii dôkazy, že vybraný kmeň, ktorý sa použije, má zodpovedajúcu plodnosť a vnímavosť. Na účely zistenia vývojovej neurotoxicity je potrebné zdokumentovať spoľahlivosť a citlivosť ostatných druhov.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Takisto možno obrátiť svetelný cyklus pred párením a po celú dobu štúdie s cieľom posúdiť funkčné a behaviorálne sledované parametre počas obdobia tmy (pri červenom svetle), t. j. v čase, keď sú zvieratá zvyčajne aktívne (22). Akékoľvek zmeny cyklu striedania svetla a tmy by mali zahŕňať primeraný čas na aklimatizáciu, aby sa zvieratá mohli prispôsobiť novému cyklu. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Druh krmiva a vody by sa mal uviesť do správy a krmivo aj voda sa analyzujú s cieľom zistiť, či neobsahujú kontaminanty.
9. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivito alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v kliebkach. Párenie sa uskutoční v kliebkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Po spárení alebo najneskôr do 15. dňa gravidity sa spárené zvieratá umiestnia do samostatných kliebok určených na vrh alebo pre matky. Kliebky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Krátko pred termínom vrhu sa spáreným samiciam poskytne vhodný a vymedzený hniezdiaci materiál. Je všeobecne známe, že nesprávne zaobchádzanie alebo stres počas gravidity môže viesť k nežiaducim následkom, napríklad k prenatálnej strate alebo k zmene fetálneho alebo postnatálneho vývinu. Aby sa zabránilo strate plodu v dôsledku faktorov, ktoré nesúvisia so zaobchádzaním, malo by sa so zvieratami počas gravidity zaobchádzať starostlivo a nemali by sa vystavovať stresu v dôsledku vonkajších faktorov, akým je napr. nadmerný hluk zvonka.

Príprava zvierat

10. Mali by sa použiť zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali v laboratórnych podmienkach a neboli predmetom predchádzajúcich experimentálnych postupov, pokiaľ daná štúdia nie je zahrnutá do inej štúdie (pozri odsek 3). Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Každému zvieraťu sa prideli jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera označí. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách by podľa možnosti mali mať tú istú hmotnosť a vek a mali by byť v obvyklom rozsahu druhu a kmeňa, ktorý je predmetom štúdie. Na každú veľkosť dávky sa použijú mladé dospelé, panenské samice. Súrodenci by sa nemali páriť a treba dôkladne dbať na to, aby sa zabezpečilo, že sa nespária. Deň gravidity 0 je deň, keď sa pozoruje vaginálna zátk a/alebo spermie. Pri kupovaní zvierat od dodávateľa, ktoré sú podľa časových údajov gravidné, by sa im mala umožniť primeraná doba na aklimatizáciu (napr. 2 – 3 dni). Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolných a ošetrovaných skupín a podľa možnosti sa do týchto skupín rozdelia rovnomerne (na zabezpečenie rovnomerného rozdelenia medzi všetky skupiny sa odporúča napr. stratifikovaný náhodný postup, ako je rozdelenie na základe na telesnej hmotnosti). Samice oplodnené rovnakým samcom sa rovnomerne rozdelia do skupín.

POSTUP

Počet a pohlavie zvierat

11. Každá pokusná a kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet gravidných samíc, ktoré budú vystavené testovanej chemikálii, aby sa zabezpečil dostatočne veľký počet mláďat na účely hodnotenia neurotoxicity. Pre každú úroveň dávky sa odporúča celkom 20 vrhov. Duplicitné dávkovanie a dávkovanie rozložené do skupín je povolené, ak sa dosiahne celkový počet vrhov na skupinu, a v prípade replikátov sa použijú primerané štatistické modely.
12. Na 4. postnatálny deň (4. PND) alebo skôr (deň pôrodu je 0. PND) sa veľkosť každého vrhu upraví tak, že mláďatá navyše sa náhodne odoberú, aby sa zabezpečila jednotná veľkosť vrhu v prípade všetkých vrhov (23). Veľkosť vrhu by nemala prekročiť priemernú veľkosť vrhu kmeňa použitých hlodavcov (8 – 12). Vo vrhu by sa mal podľa možnosti nachádzať rovnaký počet samčích a samičích mláďat. Selektívne odstránenie mláďat, napr. na základe telesnej hmotnosti, nie je vhodné. Po štandardizácii vrhov (utratení) a pred ďalším testovaním funkčných sledovaných parametrov sa jednotlivé mláďatá, ktoré sa majú testovať pred odstavením alebo po odstavení od matky, jednoznačne identifikujú s využitím akejkoľvek vhodnej humánnej metódy na identifikáciu mláďat (napr. 24).

Zaradenie zvierat na funkčné a behaviorálne testy, váženie mozgu a neuropatologické hodnotenia

13. Táto testovacia metóda umožňuje rôzne prístupy, pokiaľ ide o zaradenie zvierat vystavených chemikálii v utere a prostredníctvom laktácie na funkčné a behaviorálne testy, určenie pohlavnej zrelosti, hmotnosti mozgu a neuropatologické hodnotenie (25). Ďalšie testy neurobehaviorálnych funkcií (napr. sociálneho správania), neurochémie alebo neuropatológie možno pridať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ sa tým nenaruší integrita pôvodných požadovaných testov.
14. Z každej dávkovej skupiny sa na 4. postnatálny deň alebo neskôr vyberú mláďatá a priradia sa na účely hodnotení sledovaných parametrov. Mláďatá by sa mali vybrať tak, aby boli v prípade všetkých testov podľa možnosti z každého vrhu v každej dávkovej skupine rovnako zastúpené obe pohlavia. Na účely testovania motorickej aktivity sa testuje rovnaký pár samčích a samičích mláďat všetkých vekových skupín pred odstavením od matky (pozri odsek 35). Pri všetkých ostatných testoch sa rovnaké alebo samostatné páry samcov a samic môžu priradiť na rôzne behaviorálne testy. Na účely testovania kognitívnych funkcií odstavených mláďat v porovnaní s dospelými jedincami môže byť potrebné priradiť rôzne mláďatá, aby sa predišlo chybným interpretáciám v dôsledku veku zvierat a predchádzajúcich skúseností s týmito meraniami (26)(27). Pri odstavení od matky (21. postnatálny deň) sa mláďatá, ktoré neboli vybrané na testovanie, humánnym spôsobom utratia. Akékoľvek zmeny v zaradení mláďat sa uvedú do správy. Štatistická merná jednotka je vrh (alebo matka), nie mláďa.
15. Existujú rôzne spôsoby, ako priradiť mláďatá na účely vyšetrovaní pred odstavením a po odstavení od matky, kognitívnych testov, patologických vyšetrovaní atď. (všeobecná schéma je uvedená na obrázku 1 a príklady priradenia v dodatku 1). Odporúčaný minimálny počet zvierat v každej dávkovej skupine na účely vyšetrovaní pred odstavením a po odstavení od matky je tento:

Klinické vyšetrenia a telesná hmotnosť	Všetky zvieratá
Podrobné klinické vyšetrenia	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Hmotnosť mozgu (po fixácii) 11. – 22. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Hmotnosť mozgu (bez fixácie) ~ 70. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Neuropatológia (fixácia ponorením alebo perfúziou) 11 – 22. PND	10/pohlavie (1/vrh)
Neuropatológia (fixácia perfúziou) ~ 70. PND	10/pohlavie (1/vrh)

Pohlavná zrelosť	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Iné vývojové medzníky (nepovinné)	Všetky zvieratá
Behaviorálna ontogenéza	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Motorická aktivita	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Motorické a zmyslové funkcie	20/pohlavie (1/pohlavie/vrh)
Učenie a pamäť	10/pohlavie ^(a) (1/vrh)

^(a) V závislosti od citlivosti testov kognitívnych funkcií by sa malo zvážiť vyššieho počtu zvierat, napr. 1 samca a 1 samice z každého vrhu (priradovanie zvierat je uvedené v dodatku 1) (ďalšie usmernenia o veľkosti vzorky sa uvádzajú v usmerňovacom dokumente OECD č. 43 (8)).

Dávkovanie

16. Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Dávky sa rozložia tak, aby sa toxické účinky zvyšovali. Ak tomu nebráni fyzikálno-chemický charakter alebo biologické vlastnosti chemikálie, zvolí sa najvyššia úroveň dávky s cieľom vyvolať určitú toxicitu u matiek (napr. klinické príznaky, zníženie prírastku telesnej hmotnosti (nie viac ako 10 %) a/alebo známky toxicity limitnej dávky v cieľovom orgáne). Vysoká dávka môže byť až na niektoré výnimky limitovaná na 1000 mg/kg/deň telesnej hmotnosti. Napríklad očakávaná expozícia ľudí môže indikovať, že je potrebné použiť vyššiu úroveň dávkovania. Prípadne možno vykonať pilotné štúdie alebo prípravné štúdie na zistenie rozsahu najvyššej dávky, ktorá by mala vyvolať minimálnu úroveň toxicity u matiek. Ak štandardná štúdia vývojovej toxicity alebo pilotná štúdia preukáže, že testovaná chemikália spôsobuje vývojovú toxicitu, najvyššia dávka by mala byť maximálna úroveň dávky, ktorá nespôsobí nadmernú toxicitu u mláďat alebo v utere, smrť alebo malformácie plodu v takom rozsahu, ktorý znemožní zmysluplné hodnotenie neurotoxicity. Najnižšia úroveň dávky by mala byť taká, aby nevyvolala žiadne príznaky toxicity u matiek alebo vývojovej toxicity vrátane neurotoxicity. Klesajúca postupnosť dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia súvisiaca s dávkou a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), alebo sa použijú dávky blízko detekčného limitu, ktorý by umožnil stanoviť referenčnú dávku. Dvojnásobné až štvornásobné intervaly sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej dávkovej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami.
17. Pri výbere úrovni dávok sa zohľadnia všetky existujúce údaje o toxicite, ako aj ďalšie informácie o metabolizme a toxikokinetike testovanej chemikálie alebo príbuzných materiálov. Tieto informácie môžu pomôcť aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania. Priame dávkovanie u mláďat by sa malo zvážiť z hľadiska expozície a farmakokinetických informácií (28)(29). Pred vykonaním štúdií s priamym dávkovaním by sa mali dôkladne posúdiť všetky výhody a nevýhody (30).
18. Súbežnou kontrolnou skupinou je zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina alebo kontrolná skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. Všetkým zvieratám sa bežne podá rovnaké množstvo testovanej chemikálie alebo nosiča podľa telesnej hmotnosti. Ak sa použije nosič alebo iné aditívum na uľahčenie dávkovania, je potrebné zvážiť tieto vlastnosti: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, účinky na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Nosič by nemal mať účinky, ktoré by mohli mať vplyv na interpretáciu štúdie, nemal by mať neurobehaviorálne toxické účinky ani účinky na reprodukciu alebo vývoj. U nových nosičov sa okrem kontrolnej skupiny nosiča použije zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina. So zvieratami v kontrolnej(-ých) skupine(-ách) sa zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusných skupinách.

Podávanie dávok

19. Testovaná chemikália alebo nosič sa podá spôsobom, ktorý je najrelevantnejší pre potenciálnu expozíciu na ľudí, a na základe dostupných informácií o metabolizme a distribúcii u pokusných zvierat. Spôsob podávania bude vo všeobecnosti orálny (napr. sondou, v krmive, v pitnej vode), ale možno použiť aj iné spôsoby (napr. dermálnou aplikáciou, inhaláciou) v závislosti od vlastností a očakávaných alebo známych spôsobov expozície na ľudí (ďalšie usmernenia sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 43 (8)). Výber spôsobu podávania je potrebné odôvodniť. Testovaná chemikália sa podáva každý deň približne v rovnakom čase.
20. Dávka podávaná každému zvieraťu sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Osobitnú pozornosť je však potrebné venovať nastavovaniu dávok počas posledného trimestra gravidity. Ak sa zaznamená nadmerná toxicita u ošetrovaných matiek, tieto zvieratá sa humánnym spôsobom usmrťia.
21. Testovaná chemikália alebo nosič sa podáva minimálne raz denne spáreným samiciam od okamihu implantácie (6. deň gravidity) a počas laktácie (21. postnatálny deň), aby boli mláďatá vystavené testovanej chemikálii počas prenatálneho a postnatálneho neurologického vývoja. Vek, v ktorom sa začínajú podávať dávky, trvanie a frekvencia dávkovania možno upraviť, ak sa preukáže, že takéto pokusné usporiadanie má pre expozíciu na ľudí väčší význam. Trvanie dávkovania sa pre ostatné druhy upraví tak, aby sa zabezpečila expozícia počas počiatočných fáz vývoja mozgu (t. j. fáz zodpovedajúcich prenatálnemu a počiatočnému postnatálnemu vývoju ľudského mozgu). S dávkovaním sa môže začať od začiatku gravidity (0. deň gravidity), hoci je potrebné zvážiť potenciál testovanej chemikálie spôsobiť predimplantačnú stratu. Podávaním od 6. dňa gravidity sa tomuto riziku zabráni, nezohľadnia sa však vývojové štádiá medzi 0. a 6. dňom gravidity. Ak laboratórium nakúpi zvieratá spárené na základe časových údajov, nie je praktické začať s dávkovaním na 0. deň gravidity a je vhodné začať s ním na 6. deň gravidity. Pokusné laboratórium by malo stanoviť režim dávkovania na základe relevantných informácií o účinkoch testovanej chemikálie, predchádzajúcich skúseností a logistických aspektov, ktoré môžu viesť k predĺženiu dávkovania na obdobie, keď sa mláďa odstaví od matky. Dávka by sa v deň pôrodu nemala podať tým zvieratám, ktoré ešte nevyrhli všetky svoje mláďatá. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že k expozícii mláďat dôjde prostredníctvom materského mlieka, priame dávkovanie u mláďat by sa však malo zvážiť v tých prípadoch, keď nemožno preukázať nepretržitú expozíciu mláďat. Dôkazy o nepretržitej expozícii možno získať napr. z farmakokinetických informácií, na základe toxicity u mláďat alebo zmien biomarkerov (28).

POZOROVANIA**Pozorovania u matiek**

22. Všetky matky sa dôkladne pozorujú najmenej raz denne, a to s ohľadom na ich zdravotný stav vrátane chorobnosti a úmrtnosti.
23. Počas ošetrovania a pozorovania by sa mali pravidelne vykonávať podrobnejšie klinické vyšetrenia (najmenej dvakrát počas dávkovania v období gravidity a dvakrát počas dávkovania v období laktácie) najmenej u desiatich matiek pri každej úrovni dávkovania. Zvieratá mimo domácej kletky pozorujú školení technici, ktorí nie sú informovaní, akým spôsobom boli zvieratá ošetrované, a to s využitím štandardizovaných postupov, aby sa minimalizoval stres u zvierat a zaujatosť pozorovateľa a maximalizovala sa spoľahlivosť pozorovateľa. Odporúča sa, aby vyšetrenia v danej štúdii podľa možnosti vykonával ten istý technik.
24. Pozorované príznaky sa zaznamenávajú. Vždy, keď je to možné, zaznamená sa aj závažnosť pozorovaných príznakov. Klinicky sa pozorujú okrem iného zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a autonómna aktivita (napr. slzenie, zježenie, veľkosť zreničky, nezvyčajný priebeh dýchania a/alebo dýchanie ústami, všetky nezvyčajné príznaky pri močení alebo vyprázdňovaní).
25. Všetky nezvyčajné reakcie, pokiaľ ide o polohu tela, stupeň aktivity (napr. zvýšený alebo znížený záujem o preskúmanie zvyčajného priestoru) a koordinácia pohybu, sa tiež zaznamenávajú. Zmeny chôdze (napr. tackavá chôdza, ataxia), poloha (napr. zhrbená) a reaktivita na zaobchádzanie, premiestnenie alebo iné podnety z prostredia, ako aj výskyt klonických alebo tonických pohybov, kŕče, triaška, stereotypy (napr. nadmerná starostlivosť o srst, nezvyčajné pohyby hlavou, opakovaný beh dokola), zvláštne správanie (napr. hryzenie alebo nadmerné olizovanie, seba-mrzačenie, chôdza dozadu, vydávanie zvukov) alebo agresia sa zaznamenávajú.

26. Zaznamenajú sa príznaky toxicity vrátane dňa nástupu, dennej doby, stupňa a trvania.
27. Zvieratá sa v období dávkovania v priebehu štúdie vážia najmenej raz týždenne alebo v deň pôrodu či krátko pred ním a na 21. postnatálny deň (odstavenie od matky). V prípade štúdií, v ktorých sa chemikálie podáva sondou, sa matky vážia najmenej dvakrát týždenne. Dávky sa pri každom stanovení telesnej hmotnosti podľa potreby upravujú. Spotreba potravy sa meria každý týždeň prinajmenšom v období gravidity a laktácie. V prípade expozície prostredníctvom vody sa aspoň raz týždenne meria spotreba vody.

Pozorovania u mláďat

28. Všetky mláďatá sa dôkladne pozorujú najmenej raz denne, a to s ohľadom na známky toxicity, chorobnosť a úmrtnosť.
29. Počas ošetrovania a pozorovania by sa u mláďat mali pravidelne vykonávať podrobnejšie klinické vyšetrenia. Mláďatá (aspoň jedno mláďa z každého pohlavia z každého vrhu) pozorujú školení technici, ktorí nie sú informovaní, akým spôsobom boli zvieratá ošetrované, a to s využitím štandardizovaných postupov, aby sa minimalizovala zaujatosť pozorovateľa a maximalizovala sa jeho spoľahlivosť. Odporúča sa, aby vyšetrenia podľa možnosti vykonával ten istý technik. Podľa potreby sa monitorujú prinajmenšom sledované parametre opísané v odsekoch 24 a 25 s ohľadom na pozorované vývojové štádium.
30. Zaznamenajú sa všetky príznaky toxicity u mláďat vrátane dňa nástupu, dennej doby, stupňa a trvania.

Fyzické a vývojové medzníky

31. Zmeny vývojových medzníkov pred odstavením (napr. odlepovanie ušných boltcov, otváranie očí, prerezávanie hryzákov) majú vysokú koreláciu s telesnou hmotnosťou (30)(31). Telesná hmotnosť môže byť najlepším ukazovateľom telesného vývoja. Meranie vývojových medzníkov sa preto odporúča iba vtedy, ak sa predtým preukázalo, že tieto sledované parametre prinesú ďalšie informácie. Časový harmonogram pre hodnotenie týchto parametrov je uvedený v tabuľke 1. V závislosti od očakávaných účinkov a výsledkov počiatkových meraní môže byť vhodné pridať ďalšie časy alebo vykonať merania v iných vývojových štádiách.
32. Pri posudzovaní telesného vývoja sa namiesto postnatálneho veku odporúča použiť postkoitálny vek (33). Ak sa mláďatá testujú v deň odstavenia od matky, odporúča sa, aby sa toto testovanie vykonalo pred samotným odstavením, aby sa predišlo chybné interpretácii v dôsledku stresu spojeného s odstavením. Okrem toho dva dni po odstavení by sa mláďatá nemali podrobovať žiadnemu testovaniu.

Tabuľka 1

Časový harmonogram hodnotenia telesných a vývojových medzníkov a funkčné/behaviorálne sledované parametre ^(a)

Sledované parametre	Vekové obdobie	Pred odstavením ^(b)	Dospievanie ^(b)	Mladé dospelé jedince ^(b)
---------------------	----------------	--------------------------------	----------------------------	--------------------------------------

Fyzické a vývojové medzníky

Telesná hmotnosť a klinické vyšetrenia	každý týždeň ^(c)	aspoň každé dva týždne	aspoň každé dva týždne
Hmotnosť mozgu	22. PND ^(d)		pri ukončení
Neuropatológia	22. PND ^(d)		pri ukončení
Pohlavná zrelosť	—	podľa potreby	—
Iné vývojové medzníky ^(e)	podľa potreby	—	—

Sledované parametre	Vekové obdobie	Pred odstavením ^(b)	Dospievanie ^(b)	Mladé dospelé jedince ^(b)
Funkčné/behaviorálne sledované parametre				
Behaviorálna ontogenéza		Aspoň dve merania		
Motorická aktivita (vrátane návykov)		1 -3 razy ^(f)	—	raz
Motorické a zmyslové funkcie		—	raz	raz
Učenie a pamäť		—	raz	raz

^(a) V tejto tabuľke sa uvádza minimálny počet meraní. V závislosti od očakávaných účinkov a výsledkov počiatočných meraní môže byť vhodné pridať ďalšie časy (napr. u zvierat vo vysokom veku) alebo vykonať merania v iných vývojových štádiách.

^(b) Odporúča sa, aby sa mláďatá netestovali počas dvoch dní po odstavení od matky (pozri odsek 32). Odporúčaný vek pre testovanie dospievajúcich jedincov je: na učenie a pamäť = 25. PND (± 2 dni); na motorické a zmyslové funkcie = 25. PND (± 2 dni). Odporúčaný vek pre testovanie mladých dospelých jedincov je 60 -70 PND.

^(c) Telesná hmotnosť by sa v prípade priameho dávkovania u mláďat mala merať aspoň dvakrát týždenne na účely úpravy dávky v období prudkého prírastku telesnej hmotnosti.

^(d) Hmotnosť mozgu a neuropatológiu možno hodnotiť skôr (napr. na 11. PND), ak je to vhodné (pozri odsek 39).

^(e) Okrem telesnej hmotnosti sa podľa potreby zaznamenávajú aj ďalšie vývojové medzníky (napr. otvorenie očí) (pozri odsek 31).

^(f) Pozri odsek 35.

33. Určí sa počet a pohlavie živých mláďat, napr. vizuálnou kontrolou alebo zmeraním anogenitálnej vzdialenosti (34)(35), a každé mláďa v rámci vrhu sa jednotlivito odváži pri narodení alebo krátko po ňom, aspoň raz týždenne počas laktácie a potom aspoň raz za dva týždne. Pri hodnotení pohlavnej zrelosti sa určí vek a telesná hmotnosť aspoň jedného samca a jednej samice z každého vrhu v čase, keď sa u nich pozoruje vaginálna priechodnosť (36) alebo oddelenie predkožky (37).

Behaviorálna ontogenéza

34. Ontogenéza vybraného správania sa meria aspoň u jedného mláďaťa z každého pohlavia z každého vrhu v príslušnom vekovom období, pričom na hodnotenie každého správania sa počas všetkých dní testovania použijú tie isté mláďatá. Medzi dňami merania by mali byť počas tohto obdobia rovnomerné odstupy, aby sa určila buď normálna zmena v ontogenéze daného správania, alebo zmena v ontogenéze daného správania súvisiaca s ošetrením (38). Medzi príklady správania, u ktorých možno hodnotiť ich ontogenézu, patrí: reflex rovnováhy, negatívna geotaxia a motorická aktivita (38)(39)(40).

Motorická aktivita

35. Motorická aktivita sa monitoruje (41)(42)(43)(44)(45) v období pred odstavením od matky a počas dospelosti. Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. Testy by mali trvať dostatočne dlho, aby sa počas testovania u neošetrených kontrolných skupín prejavili návyky. Na hodnotenie behaviorálnej ontogenézy sa dôrazne odporúča použitie motorickej aktivity. Ak sa motorická aktivita použije ako test behaviorálnej ontogenézy, potom sa v rámci testovania pri všetkých skúškach pred odstavením od matky použijú tie isté zvieratá. Testovania by mali prebiehať dostatočne často, aby bolo možné posúdiť ontogenézu návykov počas testu (44). Na tento účel môže byť potrebných tri alebo viac období pred dňom odstavenia vrátane dňa odstavenia (napr. na 13., 17., 21. postnatálny deň). Tie isté zvieratá alebo zvieratá z toho istého vrhu by sa mali testovať aj v dospelom veku krátko pred ukončením štúdie (napr. na 60. - 70. postnatálny deň). Podľa potreby môžu testovania prebiehať aj počas ďalších dní. Motorická aktivita sa monitoruje automatizovaným prístrojom, ktorý zaznamenáva aktivitu a ktorý by mal byť schopný detekovať zvýšenie, ako aj zníženie aktivity (t. j. základná aktivita podľa merania prístroja by nemala byť taká nízka, aby znemožňovala detekciu zníženej aktivity, ani taká vysoká, aby znemožňovala detekciu zvýšenej aktivity). Každý prístroj by sa mal otestovať štandardnými postupmi, aby sa v maximálnej miere zabezpečila spoľahlivosť fungovania všetkých prístrojov počas všetkých dní. Podľa možnosti sa ošetrené skupiny rovnomerne rozdelia medzi jednotlivé prístroje. Každé zviera sa testuje jednotlivito. Ošetrené

skupiny sa rovnomerne rozdeľujú medzi jednotlivé časy testovania, aby sa predišlo mätúcemu vplyvu denného rytmu aktivity. Je potrebné zaistiť, aby boli zmeny testovacích podmienok čo najmenšie a aby neboli systematicky spojené s ošetrovaním. Medzi premenné, ktoré môžu ovplyvniť mnoho ukazovateľov správania vrátane motorickej aktivity, patrí hladina hluku, veľkosť a tvar pokusnej kletky, teplota, relatívna vlhkosť, svetelné podmienky, pachy, použitie domácej kletky alebo novej pokusnej kletky a rozptýlenie vplyvom prostredia.

Motorické a zmyslové funkcie

36. Motorické a zmyslové funkcie sa podrobne vyšetrí najmenej raz v období dospievania a raz u mladého dospelého jedinca (napr. na 60.- 70. postnatálny deň). Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. Testovanie by malo byť dostatočné, aby sa zabezpečilo primerané kvantitatívne vzorkovanie zmyslových modalít (napr. somatické zmyslové, vestibulárne) a motorických funkcií (napr. sila, koordinácia). Medzi príklady testov motorických a zmyslových funkcií patrí reflex skríženej extenzie (46), reflex rovnováhy (47)(48), poplašná reakcia na zvukový podnet (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) a evokovaný potenciál (55).

Testy učenia a pamäte

37. Test asociatívneho učenia a pamäte sa vykoná po odstavení (napr. 25. deň $\pm$ 2 dni) a u mladých dospelých jedincov (na 60. postnatálny deň a neskôr). Informácie o testovaní v čase odstavenia od matky sa uvádzajú v odseku 32. V týchto dvoch vývojových štádiách možno použiť rovnaký test alebo samostatné testy. U odstavených a dospelých potkanov je pri výbere testov učenia a pamäte povolená určitá miera flexibility. Testy však musia byť navrhnuté tak, aby spĺňali dve kritériá. Po prvé, učenie sa posudzuje buď ako zmena schopnosti v priebehu viacerých opakovaných skúšok alebo testov, alebo v testoch, ktoré pozostávajú z jednej skúšky, s ohľadom na podmienku, ktorou sa zabezpečí kontrola neasociatívnych účinkov procesu učenia. Po druhé, testy by okrem prvotného učenia (nadobúdania zručností) mali zahŕňať meranie pamäte (krátkodobej alebo dlhodobej); toto meranie pamäte však nemožno uviesť do správy bez merania nadobúdania zručností z toho istého testu. Ak testy učenia a pamäte odhalia účinok testovanej chemikálie, možno zvážiť ďalšie testy, aby sa vylúčili alternatívne interpretácie na základe zmien zmyslových, motivačných a/alebo motorických schopností. Okrem dvoch uvedených kritérií sa odporúča, aby sa test učenia a pamäte vybral na základe jeho preukázanej citlivosti na triedu skúmanej chemikálie, pokiaľ sú takéto informácie k dispozícii v literatúre. Ak takéto informácie nie sú k dispozícii, medzi príklady testov, ktoré možno vykonať na splnenie týchto kritérií, patrí: pasívne vyhýbanie sa (43)(56)(57), oneskorená reakcia na pozíciu u dospelých potkanov (58) a nedospelých potkanov (59), úprava čuchových podmienok (43)(60), Morrisovo vodné bludisko (61)(62)(63), Bielovo bludisko alebo Cincinnati bludisko (64)(65), 8-ramenné radiálne bludisko (66), T-bludisko (43) a nadobúdanie a uchovávanie správania riadeného časovým harmonogramom (26)(67)(68). Ďalšie testy sú opísané v literatúre týkajúcej sa odstavených (26)(27) a dospelých potkanov (19)(20).

Vyšetrenie post mortem

38. Materské zvieratá možno po odstavení mláďat utraťiť.
39. Neuropatologické hodnotenie mláďat sa vykoná s využitím tkanív z humánne usmrtených zvierat na 22. postnatálny deň alebo skôr, medzi 11. a 22. postnatálnym dňom, a tiež pri ukončení štúdie. U mláďat usmrtených na 22. postnatálny deň sa posudzuje mozgové tkanivo; u zvierat usmrtených na konci sa posudzujú tkanivá centrálnej nervovej sústavy (CNS), ako aj tkanivá periférnej nervovej sústavy (PNS). Zvieratá usmrtené na 22. postnatálny deň alebo skôr možno fixovať ponorením alebo perfúziou. Zvieratá usmrtené na konci štúdie sa fixujú perfúziou. Všetky aspekty prípravy vzoriek tkanív, od perfúzie zvierat, po pitvu vzoriek tkanív, spracovanie tkanív a farbenie sklíčok by sa mali vykonať podľa vyváženej schémy, aby každá sada obsahovala reprezentatívne vzorky z každej dávkovej skupiny. Ďalšie usmernenia k neuropatológii sa uvádzajú v usmerňovacom dokumente OECD č. 20 (9), pozri aj (103).

Spracovanie vzoriek tkanív

40. Všetky makroskopické abnormality viditeľné v čase autopsie by sa mali zaznamenať. Vzorky odobratých tkanív by mali reprezentovať všetky hlavné oblasti nervovej sústavy. Vzorky tkanív sa uchovávajú vo vhodnom fixačnom prostriedku a spracujú sa v súlade so štandardizovanými uverejnenými histologickými protokolmi (69)(70)(71)(103). Zaliatie do parafínu je v prípade tkanív CNS a PNS povolené, ak sa však požaduje vyšší stupeň rozlíšenia, môže byť vhodné použiť osmium po fixácii spolu so zaliatím do epoxidu (napr. v prípade periférnych nervov pri podozrení na periférnu neuropatiu a/alebo pri morfolometrickej analýze periférnych nervov). Mozgové tkanivo

odobraté na morfometrickú analýzu sa zaleje do vhodného prostriedku pri všetkých úrovniach dávky súčasne, aby sa predišlo zmenšeniu bunkových štruktúr, ktoré môže súvisieť s predĺženým skladovaním vo fixačnom prostriedku (6).

Neuropatologické vyšetrenie

41. Účelom kvalitatívneho vyšetrenia je:

- i) identifikovať oblasti v rámci nervovej sústavy, ktoré vykazujú známky neuropatologických zmien;
- ii) identifikovať typy neuropatologických zmien, ktoré sú dôsledkom expozície účinkom testovanej chemikálie; a
- iii) stanoviť rozsah závažnosti neuropatologických zmien.

Reprezentatívne histologické rezy zo vzoriek tkaniva pod mikroskopom preskúma na tento účel vyškolený patológ s cieľom zistiť neuropatologické zmeny. Všetkým neuropatologickým zmenám sa priradí subjektívna známka indikujúca závažnosť. Na hodnotenie rezov mozgu zo zvierat humánne usmrtených na 22. postnatálny deň alebo skôr môže postačovať farbenie hematoxylínom a eozínom. Pre rezy tkanív CNS a PNS zo zvierat usmrtených na konci štúdie sa však odporúča farbenie myelínom (napr. luxol fast blue/kresyl violet) a striebrom (napr. Bielschowskeho alebo Bodianova metóda). Na základe odborného posúdenia patológa a druhu pozorovaných zmien možno zvážiť iné farbenie vhodné na identifikáciu a charakterizáciu osobitných typov zmien (napr. gliový fibrilárny acidický proteín (GFAP) alebo lektínovú histochemiu na posúdenie gliových a mikrogliových zmien (72), farbenie farbivom Fluoro-Jade na detekciu nekrózy (73)(74) alebo farbenie striebrom špecifické pre nervovú degeneráciu (75)).

42. Malo by sa vykonať morfometrické (kvantitatívne) hodnotenie, keďže tieto údaje môžu pomôcť pri detekcii účinkov spojených s ošetrovaním a majú význam pre interpretáciu rozdielov hmotnosti alebo morfológie mozgu súvisiacich s aplikáciou chemikálie (76)(77). Na účely morfometrického hodnotenia sa odoberie a pripraví nervové tkanivo. Súčasťou morfometrických hodnotení môžu byť napr. lineárne alebo plošné merania špecifických oblastí mozgu (78). Na lineárne alebo plošné merania je potrebné použiť homologické rezy, ktoré sa uvažlivo zvolia na základe spoľahlivých mikroskopických medzníkov (6). Na zistenie účinkov v dôsledku ošetrovania v prípade parametrov, ako je objem alebo počet buniek konkrétnych neuroanatomických oblastí (79)(80)(81)(82)(83)(84), možno použiť stereológiu.

43. Mozgy sa vyšetria, aby sa zistilo, či nevykazujú známky neuropatologických zmien súvisiacich s ošetrovaním, a na zabezpečenie dôkladného vyšetrenia sa vhodné vzorky odoberú zo všetkých hlavných oblastí mozgu (napr. čuchové bulvy, mozgová kôra, hipokampus, bazálne gangliá, talamus, hypotalamus, stredný mozog (tectum), tegmentum a mozgové stopky), Varolov most, predĺžená miecha, mozoček). Je dôležité, aby sa rezy u všetkých zvierat odobrali v rovnakej rovine. U dospelých jedincov humánne usmrtených na konci štúdie sa odoberú reprezentatívne vzorky rezov miechy a PNS. Vyšetria sa tieto oblasti: oko s očným nervom a sietnicou, zväčšená miecha na krčných a bedrových častiach, tkanivá chrbtové a dutiny, proximálny sedací nerv, proximálny tibialný nerv (na kolene) a tibialné vetvy nervu lýtkového svalu. Rezy tkanív miechy a periférnych nervov budú obsahovať krížové, ako aj priečne a pozdĺžne rezy.

44. Neuropatologické hodnotenie zahŕňa vyšetrenie príznakov vývojového poškodenia nervovej sústavy (6)(85)(86)(87)(88)(89), okrem bunkových zmien (napr. neuronálna vakuolizácia, degenerácia, nekróza) a zmeny tkanív (napr. glióza, leukocytová infiltrácia, tvorba cýst). V tejto súvislosti je dôležité, aby sa účinky v dôsledku ošetrovania odlišili od bežných vývojových udalostí, o ktorých je známe, že sa vyskytujú vo vývinovom štádiu, ktoré zodpovedá dobe utratenia (90). Príklady významných zmien, ktoré svedčia o narušení vývoja, zahŕňajú nielen:

- zmeny makroskopickej veľkosti alebo tvaru čuchových bulbov, mozgu alebo mozočka,
- zmeny relatívnej veľkosti rôznych oblastí mozgu vrátane zmenšenia alebo zväčšenia oblastí v dôsledku straty alebo pretrvávania bežne prechodných populácií buniek alebo axonálnych projekcií (napr. vonkajšia zárodočná vrstva mozočka, kalózne teleso),
- zmeny proliferácie, migrácie a diferenciácie, ako indikujú oblasti nadmernej apoptózy alebo nekrózy, zhľuky alebo rozptýlené populácie ektopických, dezorientovaných alebo poškodených neurónov alebo zmeny relatívnej veľkosti rôznych vrstiev kortikálnych štruktúr,

- zmeny štruktúr myelinizácie vrátane celkového zmenšenia alebo zmeny zafarbenia myelinizovaných štruktúr,
- známky hydrocefalu, najmä zväčšenie dutín, stenóza Sylviovho kanálika a stenčenie mozgových hemisfér.

Analýza vzťahu medzi dávkou a reakciou v prípade neuropatologických zmien

45. Na kvalitatívne a kvantitatívne neuropatologické analýzy sa odporúča tento postup. Najprv sa porovnajú rezy zo skupiny s vysokou dávkou s rezmi z kontrolnej skupiny. Ak zvieratá zo skupiny s vysokou dávkou nejavia známky neuropatologických zmien, ďalšia analýza nie je potrebná. Ak sa v skupine s vysokou dávkou zistia neuropatologické zmeny, potom sa vyšetrí zvieratá zo skupiny so stredne veľkou dávkou a s vysokou dávkou. Ak je skupina s vysokou dávkou ukončená v dôsledku smrti alebo inej neobjasnenej toxicity, skupiny s vysokou a stredne veľkou dávkou sa podrobia analýze na neuropatologické zmeny. Ak sa v skupinách s nižšími dávkami prejavujú známky neurotoxicity, tieto skupiny sa podrobia neuropatologickej analýze. Ak sa pri kvalitatívnom alebo kvantitatívnom vyšetrení zistia akékoľvek neuropatologické zmeny v dôsledku ošetrovania, určí sa výskyt v závislosti od dávky, frekvencia a stupeň závažnosti poškodení alebo morфометrických zmien, a to na základe hodnotenia všetkých zvierat zo všetkých dávkových skupín. Do tohto hodnotenia sa zahrnú všetky oblasti mozgu, ktoré vykazujú známky neuropatologických zmien. Pri každom type poškodenia sa uvedú charakteristiky používané na vymedzenie jednotlivých stupňov závažnosti a vlastnosti používané na rozlíšenie jednotlivých stupňov. Frekvencia jednotlivých typov poškodení a ich závažnosti sa zaznamená a vykoná sa štatistická analýza, ktorá vyhodnotí povahu vzťahov medzi dávkou a reakciou. Odporúča sa použiť kódované skĺčka (91).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Údaje sa do správy uvedú jednotlivo a zhrnú sa v tabuľke, pričom pri každej pokusnej skupine sa uvedú typy zmien a počet matiek, mláďatá podľa pohlavia a vrhy pri jednotlivých typoch zmien. Ak u mláďat došlo k priamej postnatálnej expozícii, do správy sa uvedie spôsob, trvanie a čas expozície.

Hodnotenie a interpretácia výsledkov

47. Štúdiá vývojovej neurotoxicity prinesie informácie o účinkoch opakovanej expozície účinkom chemikálie *in utero* a v počiatočnom postnatálnom vývojovom štádiu. Keďže dôraz sa kladie tak na všeobecnú toxicitu, ako aj vývojovú neurotoxicitu, výsledky štúdie umožnia rozlíšenie medzi účinkami na neurologický vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity u matky, a účinkami, ktoré sa prejavujú iba pri dávkach, ktoré sú toxické aj pre materské zviera. Vzhľadom na zložité vzájomné súvislosti medzi plánom štúdie, štatistickou analýzou a biologickou významnosťou údajov je súčasťou primeranej interpretácie údajov o vývojovej neurotoxici aj odborný posudok (107)(109). Interpretácia výsledkov testov by mala byť založená na prístupe váhy dôkazov (20)(92)(93)(94). Štruktúra behaviorálnych alebo morfológických nálezov, pokiaľ sú prítomné, ako aj dôkazy o vzťahu medzi dávkou a reakciou sa rozoberú. Údaje zo všetkých štúdií, ktoré majú význam pre hodnotenie vývojovej neurotoxicity, vrátane epidemiologických štúdií u ľudí alebo kazuistik a experimentálnych štúdií na zvieratách (napr. toxikokinetické údaje, informácie o vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou, údaje z iných štúdií toxicity) sa zahrnú do tejto charakterizácie. Sem patrí vzťah medzi dávkami testovanej chemikálie a prítomnosťou/neprítomnosťou, výskytom a rozsahom akýchkoľvek neurotoxických účinkov u každého pohlavia (20)(95).
48. Súčasťou hodnotenia údajov by mala byť diskusia o biologickej a štatistickej významnosti. Štatistickú analýzu treba vnímať ako nástroj, ktorý usmerňuje, nie určuje interpretáciu údajov. Chýbajúca štatistická významnosť by nemala byť jediným dôvodom pre vyvodenie záveru o účinku v dôsledku nepodania chemikálie, rovnako ako by štatistická významnosť nemala byť jediným odôvodnením pre vyvodenie záveru o účinku v dôsledku podania chemikálie. S cieľom zabezpečiť sa proti možným falošným negatívnym zisteniam a vnútorným problémom pri „dokazovaní negatívneho vzťahu“ je potrebné prediskutovať dostupné pozitívne a historické kontrolné údaje, najmä ak podanie chemikálie nevyvolá žiadne účinky (102)(106). Pravdepodobnosť falošných pozitívnych výsledkov by sa mala prediskutovať so zreteľom na celkové štatistické hodnotenie údajov (96). Hodnotenie by sa malo týkať aj vzťahu medzi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálnymi zmenami, pokiaľ takýto vzťah existuje.

49. Všetky výsledky sa analyzujú s využitím štatistických modelov, ktoré sú primerané experimentálnej schéme (108). Výber parametrickej alebo neparametrickej analýzy je potrebné odôvodniť vzhľadom na faktory, ako je povaha údajov (transformovaných alebo netransformovaných) a ich distribúcia, ako aj relatívna spoľahlivosť zvolenej štatistickej analýzy. Účel a plán štúdie by mali usmerňovať výber štatistických analýz, aby sa minimalizovali chyby typu I (falošné pozitívne) a typu II (falošné negatívne) (96)(97)(104)(105). V prípade vývojových štúdií využívajúcich multiparitné druhy, pri ktorých sa testuje viacero mláďat z jedného vrhu, by sa do štatistického modelu mal zahrnúť vrh, aby sa predišlo zvýšenej chybovosti typu I (98)(99)(100)(101). Štatistickou mernou jednotkou by mal byť vrh, nie mláďa. Pokusy by mali byť navrhnuté tak, aby sa mláďatá z toho istého vrhu nevyšetrovali nezávisle od seba. Každý sledovaný parameter, ktorý sa u toho istého objektu nameria opakovane, sa podrobí analýze s využitím štatistických modelov, ktoré zaručia, že tieto merania nebudú od seba navzájom nezávislé.

Správa o teste

50. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné údaje vrátane zdroja,
- čistota prípravku a známe a/alebo očakávané nečistoty.

Nosič (v prípade potreby):

- odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda alebo fyziologický roztok.

Pokusné zvieratá:

- použité druhy a kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,
- dodávateľ pokusných zvierat,
- počet, vek na začiatku testu a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, voda atď.,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

- odôvodnenie výberu úrovne dávok,
- odôvodnenie spôsobu podávania a časového trvania,
- špecifikácia podávaných dávok, vrátane údajov o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávaného materiálu,
- údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,
- metóda použitá na jednoznačnú identifikáciu matiek a mláďat,
- podrobný opis postupu randomizácie použitého na priradenie matiek do ošetrovaných skupín, na výber mláďat na utratenie a na priradenie mláďat do testovaných skupín,
- údaje o podávaní testovanej chemikálie,
- konverzia z koncentrácie testovanej chemikálie v strave/vode (ppm) alebo pri inhalácii na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,
- podmienky prostredia,
- údaje o kvalite potravy a vody (napr. voda z vodovodu, destilovaná),
- dátum začiatku a konca štúdie.

Pozorovania a postupy testovania:

- podrobný opis postupov použitých na štandardizáciu pozorovaní a postupov, ako aj operačné vymedzenia pre vyhodnocovanie pozorovaní,
- zoznam všetkých použitých postupov testovania a odôvodnenie ich použitia,
- údaje o použitých behaviorálnych/funkčných, patologických, neurochemických alebo elektrofyziológických postupoch vrátane informácií a údajov o automatizovaných prístrojoch,
- postupy kalibrácie a na zabezpečenie rovnocennosti prístrojov a vyváženosti ošetrovaných skupín v postupoch testovania,
- stručné odôvodnenie všetkých rozhodnutí zahŕňajúcich odborné posúdenie.

Výsledky (individuálne a zhrnuté vrátane strednej hodnoty a rozptylu v prípade potreby):

- počet zvierat na začiatku štúdie a ich počet na konci štúdie,
- počet zvierat a vrhov použitých pri jednotlivých metódach testovania,
- identifikačné číslo každého zvieraťa a vrh, z ktorého pochádza,
- veľkosť vrhu a stredná hmotnosť pri narodení podľa pohlavia,
- údaje o telesnej hmotnosti a o zmene telesnej hmotnosti vrátane konečnej telesnej hmotnosti matiek a mláďat,
- údaje o spotrebe potravy a vody, ak je to vhodné (napr. ak sa testovaná chemikália podáva vo vode),
- údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane známk toxicity alebo úmrtnosti, času a príčiny smrti, ak je to vhodné,
- charakter, závažnosť, trvanie, deň začiatku, denná doba a následný priebeh podrobných klinických vyšetrení,
- hodnotenie jednotlivých vývojových medzníkov (hmotnosť, pohlavná zrelosť a behaviorálna ontogenéza) v každom období vyšetrenia,
- podrobný opis všetkých behaviorálnych, funkčných, neuropatologických, neurochemických, elektrofyziológických nálezov podľa pohlavia, ako aj zvýšeného alebo zníženého výskytu u kontrolných skupín,
- pitevné nálezy,
- hmotnosť mozgu,
- všetky diagnózy vyvedené na základe neurologických známk a poškodení vrátane ochorení alebo podmienok, ktoré sa vyskytnú prirodzene,
- snímky exemplárnych nálezov,
- snímky vytvorené pri nízkej spotrebe na posúdenie homológie rezov použitých pri morfometrii,
- údaje o absorpcii a metabolizme vrátane doplňujúcich údajov zo samostatnej toxikokinetickej štúdie, ak je k dispozícii,
- štatistické spracovanie výsledkov vrátane štatistických modelov použitých na analýzy údajov a výsledky bez ohľadu na ich významnosť,
- zoznam pracovníkov, ktorí sa zúčastnili štúdie, a odborná príprava.

Rozbor výsledkov:

- údaje o vzťahu medzi dávkou a reakciou podľa pohlavia a skupiny,
- vzťah medzi inými toxickými účinkami pre výsledné posúdenie neurotoxického potenciálu testovanej chemikálie podľa pohlavia a skupiny,

- vplyv akýchkoľvek toxikokinetických informácií na výsledné posúdenie,
- podobnosti účinkov s účinkami akýchkoľvek známych neurotoxických látok,
- údaje, ktoré preukazujú spoľahlivosť a citlivosť testovacej metódy (t. j. pozitívne a historické kontrolné údaje),
- vzťah medzi neuropatologickými a funkčnými účinkami, ak existuje,
- NOAEL alebo referenčná dávka pre matky a mláďatá podľa pohlavia a skupiny.

Záver:

- rozbor celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane výsledného posúdenia, či testovaná chemikália viedla k vývojovej neurotoxickosti a NOAEL alebo nie.

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kodaň, Dánsko, 13.-14. jún 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. október 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, Paríž. Júl 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, Paríž, 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 tejto prílohy, One-generation reproduction toxicity study.
15. Kapitola B.35 tejto prílohy, Two-generation reproduction toxicity study.
16. Kapitola B.43 tejto prílohy, Neurotoxicity Study in Rodents.
17. Kapitola B.31 tejto prílohy, Prenatal developmental toxicity study.
18. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely Ú. v. EÚ 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/ehc060.htm>].
20. WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Ženeva. Dostupné na: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/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 (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
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. *A Literature Review. Reprod.*, 17:298 -303.
38. Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489 -95.
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.) Plenum 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.) Plenum 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.*, 64:661 - 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.

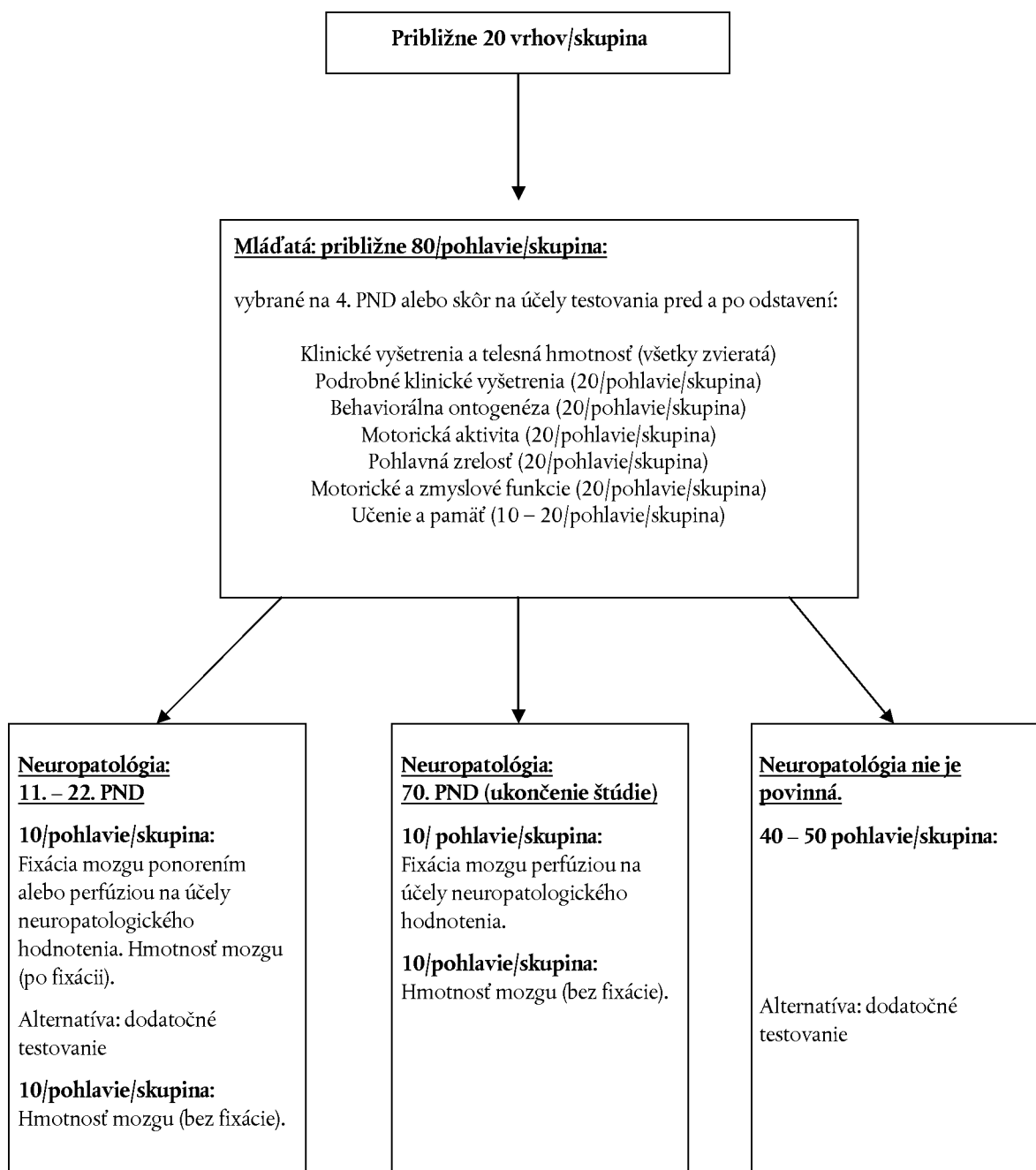
57. Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247 -296.
58. Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed 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, Londýn.
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 KF, Catalano SM. (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-0644A.
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 - 90.
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.

Obrázok 1.

Všeobecná schéma testovania pre funkčné/behaviorálne testy, neuropatologické hodnotenie a určenie hmotnosti mozgu. Tento diagram vychádza z opisu v odsekoch 13 - 15 (PND = postnatálny deň). Príklady priradenia sú uvedené v dodatku 1



Dodatok 1

1. Príklady možného priradenia sú opísané a uvedené v tabuľkách nižšie. Tieto príklady sú poskytnuté s cieľom názorne poukázať, že existuje viacero rôznych spôsobov, ako priradiť pokusné zvieratá k rôznym testovacím modelom.

Príklad 1

2. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy pred odstavením. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 22. postnatálny deň. Mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie. Okrem toho sa získajú údaje o hmotnosti mozgov podľa mozgov zo zvyšných 10 samcov a 10 samíc pri každej úrovni dávky.
3. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na funkčné/behaviorálne testy po odstavení (podrobné klinické vyšetrenia, motorická aktivita, testovanie poplašnej reakcie na zvukový podnet a kognitívnych funkcií u dospievajúcich jedincov) a hodnotenie veku pohlavnej zrelosti. Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in-situ sa mozog odoberie a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.
4. Na testovanie kognitívnych funkcií u mladých dospelých jedincov (napríklad na 60. - 70. postnatálny deň) sa použije tretí súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu). Z týchto zvierat sa na konci štúdie 10 zvierat/pohlavie/dávku (1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) usmrtí a mozog sa odoberie a odváži.
5. Zvyšných 20 zvierat/pohlavie/skupinu je vyhradených pre možné ďalšie testy.

Tabuľka 1

Mláďa č. ^(a)		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc 10 samcov + 10 samíc	Behaviorálna ontogenéza Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu na 22. PND Hmotnosť mozgu na 22. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Podrobné klinické vyšetrenia Motorická aktivita Pohlavná zrelosť Motorické a zmyslové funkcie Učenie a pamäť (25. PND) Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND
3	7	20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci) Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov ~ 70. PND
4	8	—	Zvieratá určené ako náhrada alebo na ďalšie testy

^(a) V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.

Príklad 2

6. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy pred odstavením. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 11. postnatálny deň. Mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie.
7. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na vyšetrenie po odstavení (podrobné klinické vyšetrenia, motorická aktivita, hodnotenie veku pohlavnej zrelosti a motorických a zmyslových funkcií). Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in situ sa mozog odoberie, odváži a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.
8. Na testovanie kognitívnych funkcií u dospievajúcich a mladých dospelých jedincov sa použije 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu). Na testovanie kognitívnych funkcií na 23. postnatálny deň a u mladých dospelých jedincov sa použijú rôzne pokusné zvieratá. Na konci sa 10 zvierat/pohlavie/skupinu, ktoré boli testované ako dospelé jedince, usmrtí a ich mozog sa odoberie a odváži.
9. Zvyšných 20 zvierat/pohlavie/skupinu, ktoré neboli vybrané pre testovanie, sa usmrtí a vyradí pri odstavení.

Tabuľka 2

Mláďa č. (a)		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Behaviorálna ontogenéza Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu na 11. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Podrobné klinické vyšetrenia Motorická aktivita Pohlavná zrelosť Motorické a zmyslové funkcie Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND
3	7	10 samcov + 10 samíc (b)	Učenie a pamäť (23. PND)
3	7	10 samcov + 10 samíc (b)	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci) Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov
4	8	—	Zvieratá usmrtené a vyradené na 21. PND

(a) V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.

(b) Na kognitívne testy na 23. PND a u mladých dospelých jedincov sa použijú rôzne mláďatá (napr. párne/nepárne vrhy z celkového počtu 20).

Príklad 3

10. Jeden súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na hodnotenie hmotnosti a neuropatológie mozgu na 11. postnatálny deň. Z týchto zvierat sa 10 mláďat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) humánne usmrtí na 11. postnatálny deň a mozog zvierat sa odoberie, odváži a spracuje pre histopatologické hodnotenie. Okrem toho sa získajú údaje o hmotnosti mozgov podľa mozgov zo zvyšných 10 samcov a 10 samíc pri každej úrovni dávky.

11. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie behaviorálnej ontogenézy (motorickej aktivity), vyšetrenia po odstavení (motorická aktivita a hodnotenie veku pohlavnej zrelosti) a testovanie kognitívnych funkcií u dospievajúcich jedincov.
12. Ďalší súbor 20 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu) sa použije na testovanie motorických a zmyslových funkcií (poplašná reakcia na zvukový podnet) a podrobné klinické vyšetrenia. Z týchto zvierat sa na konci štúdie (približne na 70. postnatálny deň) podá 10 zvieratám/pohlavie/dávku (t. j. 1 samcovi alebo 1 samici z každého vrhu) anestézia a zafixujú sa použitím perfúzie. Po ďalšom fixovaní in situ sa mozog odoberie, odváži a spracuje pre neuropatologické hodnotenie.
13. Ďalší súbor 20 mláďat/pohlavie/dávku sa použije na testovanie kognitívnych funkcií u mladých dospelých jedincov (t. j. 1 samec a 1 samica z každého vrhu). Z týchto zvierat sa na konci štúdie 10 zvierat/pohlavie/dávku (t. j. 1 samec alebo 1 samica z každého vrhu) usmrtí a ich mozog sa odoberie a odváži.

Tabuľka 3

Mláďa č. ^(a)		Počet mláďat priradených na test	Vyšetrenie/test
samce	samice		
1	5	10 samcov + 10 samíc 10 samcov + 10 samíc	Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu na 11. PND Hmotnosť mozgu na 11. PND
2	6	20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc	Behaviorálna ontogenéza (motorická aktivita) Motorická aktivita Pohlavná zrelosť Učenie a pamäť (27. PND)
3	7	20 samcov + 20 samíc 20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Poplašná reakcia na zvukový podnet (dospievajúce a mladé dospelé jedince) Podrobné klinické vyšetrenia Hmotnosť/neuropatológia/morfometria mozgu u mladých dospelých jedincov ~70. PND
4	8	20 samcov + 20 samíc 10 samcov + 10 samíc	Učenie a pamäť (mladí dospelí jedinci) Hmotnosť mozgu u mladých dospelých jedincov

^(a) V tomto príklade sú vrhy zredukované na 4 samcov + 4 samice; samčie mláďatá sú označené číslami 1 až 4, samičie mláďatá číslami 5 až 8.

*Dodatok 2***Vymedzenia pojmov**

Chemikália: látka alebo zmes

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy

B.54. UTEROTROFICKÝ BIOLOGICKÝ TEST U HLODAVCOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA ESTROGÉNNÉ VLASTNOSTI**ÚVOD**

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie TG 440 (2007). Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov potenciálnych endokrinných disruptorov (1). Súčasťou tejto činnosti bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie uterotrofického biologického testu u hlodavcov. Uterotrofický biologický test u hlodavcov vtedy prešiel rozsiahlym programom validácie, ktorého súčasťou bolo vypracovanie podrobného podkladového dokumentu (2)(3) a vykonanie rozsiahlych intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdií s cieľom preukázať význam a reprodukovateľnosť biologického testu s použitím silného referenčného estrogénu, slabých agonistov estrogénnych receptorov, silných antagonistov estrogénnych receptorov a negatívnej referenčnej chemikálie (4)(5)(6)(7)(8)(9). Testovacia metóda B.54 je výsledkom skúseností nadobudnutých počas programu validácie testu a výsledkov získaných pomocou tohto testu s estrogénnymi agonistami.
2. Uterotrofický biologický test je krátkodobý skríningový test, ktorý vznikol v 30. rokoch 20. storočia (27)(28), a odborný výbor ho prvýkrát štandardizoval na skríning v roku 1962 (32)(35). Je založený na zvýšení hmotnosti maternice alebo uterotrofickej reakcii (pre posúdenie pozri 29). Hodnotí schopnosť chemikálie vyvolať biologické aktivity zodpovedajúce agonistom alebo antagonistom prirodzených estrogénov (napr. 17 β -estradiol), na zistenie antagonistov sa však používa oveľa menej ako na zistenie agonistov. Maternica reaguje na estrogény dvoma spôsobmi. Prvá reakcia je nárast hmotnosti v dôsledku nasiaknutia vody. Po tejto reakcii nasleduje hmotnostný prírastok v dôsledku rastu tkaniva (30). Reakcie maternice u potkanov a myši sú kvalitatívne porovnateľné.
3. Tento biologický test slúži ako skríningový test in vivo a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte „Konceptného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov“ (dodatok 2). V tomto konceptnom rámci je uterotrofický biologický test zahrnutý do úrovne 3 ako test in vivo poskytujúcu údaje o jednom endokrinnom mechanizme, t. j. o estrogénnych účinkoch.
4. Uterotrofický biologický test sa má zahrnúť do skupiny testov in vitro a in vivo, ktorých cieľom je identifikovať chemikálie s potenciálnym pôsobením na endokrinný systém a v konečnom dôsledku posúdiť riziká pre ľudské zdravie alebo životné prostredie. Vo validačnom programe OECD sa použili silní aj slabí estrogénni agonisti s cieľom zhodnotiť účinnosť testu pri identifikácii estrogénnych chemikálií (4)(5)(6)(7)(8). Okrem dobrej intralaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti sa tak preukázala aj citlivosť postupu testovania pre estrogénnych agonistov.
5. Pokiaľ ide o negatívne chemikálie, do validačného programu bola zahrnutá iba jedna „negatívna“ referenčná chemikália, ktorej negatívne účinky potvrdil uterotrofický test, ako aj testy viazania receptorov in vitro a testy receptorov, na základe testov, ktoré nesúvisia s validačným programom OECD, však boli vyhodnotené dopĺňajúce údaje, ktoré tiež potvrdzujú špecifickosť uterotrofického biologického testu pre skríning estrogénnych agonistov (16).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

6. Estrogénni agonisti a antagonisti pôsobia ako ligandy pre estrogénne receptory a a b a môžu v uvedenom poradí aktivovať alebo brániť transkripčnému pôsobeniu receptorov. Výsledkom môžu byť nepriaznivé zdravotné riziká vrátane účinkov na rozmnožovanie a vývoj. Existuje preto potreba rýchleho posudzovania a hodnotenia chemikálií ako možných estrogénnych agonistov a antagonistov. Afinita ligandu pre estrogénny receptor alebo transkripčná aktivácia reportérových génov in vitro je iba jedným z viacerých faktorov poukazujúcich na možné riziko, hoci má iba informatívnu hodnotu. Ďalšie faktory môžu zahŕňať metabolickú aktiváciu a deaktiváciu pri vstupe do tela, distribúciu do cieľových tkanív a odstránenie z tela v závislosti – aspoň sčasti – od spôsobu podávania a od testovanej chemikálie. Ak z vlastností chemikálie týkajúcich sa absorpcie – distribúcie – metabolizmu – eliminácie (ADME) nevyplývajú príslušné informácie, vzniká potreba testovať možné účinky chemikálie in vivo za relevantných podmienok. Maternicové tkanivá reagujú na stimuláciu estrogénmi rýchlym a intenzívnym rastom, najmä u laboratórnych hlodavcov, u ktorých estrálny cyklus trvá približne 4 dni. Hlodavce, najmä potkany, sa takisto všeobecne používajú v štúdiách toxicity na charakterizáciu rizika. Preto je maternica hlodavcov vhodný cieľový orgán na testovanie estrogénnych agonistov a antagonistov in vivo.
7. Táto testovacia metóda je založená na protokoloch použitých pri validačnej štúdii OECD, ktoré sa v intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách ukázali ako spoľahlivé a opakovateľné (5)(7). V súčasnosti sú k dispozícii dve metódy, t. j. metóda, pri ktorej sa používajú dospelé samice po ovariectómii (metóda dospelých samíc po ovx),

a metóda, pri ktorej sa používajú nedospelé samice bez ovariektómie (metóda nedospelých samíc). V programe validácie testov OECD sa ukázalo, že obe metódy majú porovnateľnú citlivosť a reprodukovateľnosť. Metóda nedospelých samíc je však o niečo menej špecifická, keďže má neporušenú os hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG), zahŕňa však väčší rozsah vyšetrovania ako metóda dospelých samíc po ovx, pretože môže reagovať na chemikálie, ktoré pôsobia na os HPG a nie len na estrogénny receptor. Os HPG začína u potkana fungovať približne vo veku 15 dní. Predtým nie je možné pubertu urýchliť liečbou, napr. pomocou GnRH. Keď samice začnú pohlavne dospievať, samica má pred otvorením vagíny niekoľko tichých cyklov, ktoré nemajú za následok otvorenie vagíny alebo ovuláciu, ale vyskytujú sa u nej určité hormonálne výkyvy. Ak chemikália priamo alebo nepriamo stimuluje os HPG, výsledkom je predčasná pohlavná zrelosť, skorá ovulácia a urýchlené otvorenie vagíny. Takéto účinky nemajú iba chemikálie, ktoré pôsobia na os HPG, ale aj niektoré krmivá, ktoré majú vyššie hladiny metabolizovateľnej energie ako iné a stimulujú rast a urýchľujú otvorenie vagíny, aj keď nemajú estrogénny charakter. Takéto chemikálie by u dospelých zvierat po ovariektómii nevyvolali uterotrofickú reakciu, pretože ich os HPG nie je funkčná.

8. V záujme dobrých životných podmienok zvierat by sa mala uprednostniť metóda, pri ktorej sa používajú nedospelé potkany, čím sa predíde chirurgickej predpríprave zvierat a tiež možnému nevyužitiu zvierat, ktoré vykazujú akékoľvek znaky začínajúceho estrálneho cyklu (pozri odsek 30).
9. Uterotrofická reakcia nemá výhradne estrogénny pôvod, t. j. reakciu môžu vyvolať aj chemikálie, ktoré nie sú estrogénnymi agonistami alebo antagonistami. Napríklad relatívne vysoké dávky progesterónu, testosterónu alebo rôznych syntetických progestínov môžu viesť k stimulačnej reakcii (30). Každá reakcia sa môže histologicky analyzovať na keratinizáciu a kornifikáciu vagíny (30). Pozitívny výsledok uterotrofického biologického testu by mal bez ohľadu na možný pôvod reakcie zvyčajne viesť k ďalším opatreniam s cieľom lepšie ho objasniť. Ďalší dôkaz o estrogénnych účinkoch by mohol vyplývať z testov *in vitro*, napríklad z testu viazania estrogénnych receptorov a testu transkripčnej aktivity, alebo z iných testov *in vivo*, napríklad z testu samičieho pohlavného dospievania.
10. Vzhľadom na to, že uterotrofický biologický test slúži ako skríningový test *in vivo*, zvolený validačný prístup splnil svoj účel z hľadiska ohľadu na životné podmienky zvierat aj z hľadiska stratégie viacúrovňového testovania. Na tento účel sa úsilie zameralo na presnú validáciu reprodukovateľnosti a citlivosti na estrogénne účinky – čo je hlavný problém v prípade mnohých chemikálií – zatiaľ čo na zložku testu týkajúcu sa antiestrogénnych účinkov bolo vynaložené nepatrné úsilie. Vzhľadom na veľmi obmedzený počet chemikálií s jednoznačnými antiestrogénnymi vlastnosťami (ktoré nie sú zakryté estrogénnymi účinkami) sa testoval iba jeden antiestrogén so silným účinkom. Preto sa táto testovacia metóda venuje estrogénnemu protokolu, zatiaľ čo protokol opisujúci režim testu so zameraním sa na antagonistov je súčasťou usmerňovacieho dokumentu (37). Reprodukovateľnosť a citlivosť testu na chemikálie s čisto antiestrogénnym pôsobením bude jasnejšie vymedzená neskôr, keď bude postup testovania nejakú dobu v rutinej prevádzke a identifikujú sa ďalšie chemikálie s týmto druhom pôsobenia.
11. Je zjavné, že všetky postupy využívajúce zvieratá musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (38). Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (25).
12. Podobne ako pri všetkých testoch využívajúcich živé zvieratá je dôležité pred začiatkom testu zabezpečiť, aby boli údaje naozaj nevyhnutné. Napríklad dve podmienky, pri ktorých môžu byť údaje potrebné, sú:
 - potenciál vysokej expozície (úroveň 1 koncepčného rámca, dodatok 2) alebo známky estrogénnych účinkov (úroveň 2) s cieľom skúmať, či takéto účinky môžu nastať *in vivo*,
 - účinky poukazujúce na estrogénne účinky v testoch *in vivo* na úrovni 4 alebo 5 s cieľom preukázať, že účinky sa týkali estrogénneho mechanizmu, ktorý nie je možné objasniť pomocou testu *in vitro*.
13. Vymedzenia pojmov použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

14. Citlivosť uterotrofického biologického testu je založená na systéme testovania na zvieratách, v ktorom os hypotalamus-hypofýza-vaječníky nie je funkčná, čo má za následok nízke hladiny endogénneho estrogénu v obehu. Zabezpečí sa tak nízka východisková hmotnosť maternice a maximálny rozsah reakcie na podávané estrogény. U samíc hlodavcov túto požiadavku spĺňajú dva stavy citlivosti na estrogén:
- i) nedospelé samice po odstavení a pred pubertou; a
 - ii) mladé dospelé samice po ovariektómii po uplynutí dostatočného času na regresiu maternicových tkanív.
15. Testovaná chemikália sa podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Postupné dávky testovanej chemikálie sa podávajú minimálne dvom skupinám (usmernenie sa uvádza v odseku 33) pokusných zvierat s použitím jednej úrovne dávky pri každej skupine, pričom chemikália sa podáva po dobu troch po sebe nasledujúcich dní v prípade metódy nedospelých samíc a po dobu najmenej troch po sebe nasledujúcich dní v prípade metódy dospelých samíc po ovariektómii. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. V prípade estrogénnych agonistov sa z hľadiska štatisticky významného zvýšenia posudzuje stredná hmotnosť maternice v skupinách zvierat, ktorým sa podala chemikália, v porovnaní so skupinou, ktorej sa podal nosič. Štatisticky významné zvýšenie strednej hmotnosti maternice v pokusnej skupine v tomto biologickom teste svedčí o pozitívnej reakcii.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

16. Môžu sa použiť bežne používané laboratórne kmene hlodavcov. Počas validácie sa ako príklad použili potkany z kmeňa Sprague-Dawley a Wistar. Kmene, o ktorých je známe, že majú menej citlivú maternicu, alebo sa to o nich predpokladá, sa nepoužívajú. Laboratórium musí preukázať citlivosť použitého kmeňa, ako sa uvádza v odsekoch 26 a 27.
17. Potkany a myši sa v uterotrofickom biologickom teste bežne používajú od 30. rokov 20. storočia. Validačné štúdie OECD sa vykonali iba u potkanov vzhľadom na predpoklad, že oba druhy by mali byť rovnocenné, a preto by v záujme šetrenia zdrojov a zvierat mal na celosvetovú validáciu stačiť jeden druh. Potkan je druh, ktorý sa vyberá vo väčšine štúdií reprodukčnej a vývojovej toxicity. Vzhľadom na rozsiahle historické údaje o myšiach a s cieľom rozšíriť rozsah pôsobnosti testovacej metódy uterotrofického biologického testu u hlodavcov o používanie myší ako pokusného druhu sa vykonala menšia doplnujúca validačná štúdia na myšiach (16). V súlade s pôvodným zámerom ušetriť zdroje a zvieratá bol zvolený preklenovací prístup s obmedzeným počtom testovaných chemikálií, zúčastnených laboratórií a bez testovania kódovaných vzoriek. Z preklenovacej validačnej štúdie v prípade uterotrofického biologického testu u mladých dospelých myší po ovariektómii vyplýva, že údaje získané u potkanov a myší navzájom kvalitatívne a kvantitatívne súhlasia. Ak uterotrofický biologický test prinesie výsledok, ktorý môže viesť k dlhodobej štúdii, v oboch štúdiách sa môžu použiť zvieratá z rovnakého kmeňa a zdroja. Preklenovací prístup bol obmedzený na myši po ovariektómii a správa neposkytuje podrobné údaje pre validáciu modelu nedospelých samíc, preto sa model nedospelých samíc v rámci rozsahu pôsobnosti súčasnej testovacej metódy neberie do úvahy.
18. V niektorých prípadoch sa preto môžu namiesto potkanov použiť myši. Výber tohto druhu je potrebné odôvodniť na základe toxikologických, farmakokinetických a/alebo iných kritérií. V prípade myší môžu byť potrebné zmeny v protokole. U myší je napríklad spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti vyššia ako u potkanov, preto by mal byť obsah fytoestrogénu v potrave u myší nižší ako u potkanov (9)(20)(22).

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

19. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o pokusné zvieratá. Tieto opisy starostlivosti a zaobchádzania predstavujú minimálne normy a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (38). Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (v rozsahu približne ± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala byť minimálne 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť maximálnu úroveň 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Cieľom by mala byť relatívna vlhkosť vzduchu 50 - 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé. Pokiaľ ide o denný svetelný rytmus, malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.
20. Laboratórne krmivo a pitná voda by mali byť k dispozícii neobmedzene. Mladé dospelé zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v klietkach po skupinách do troch zvierat. Vzhľadom na nízky vek nedospelých zvierat sa odporúča umiestnenie v sociálnych skupinách.

21. Je známe, že laboratórne krmivá s vysokou hladinou fytoestrogénov zvyšujú u hlodavcov hmotnosť matrice dostatočne na to, aby mali vplyv na uterotrofický biologický test (13)(14)(15). V prípade použitia nedospelých zvierat môžu vysoké hladiny fytoestrogénov a metabolizovateľnej energie v laboratórnych krmivách tiež viesť k predčasnej puberte. Prítomnosť fytoestrogénov predovšetkým súvisí s obsahom produktov zo sóje a lucerny v laboratórnych krmivách a preukázalo sa, že koncentrácie fytoestrogénov sa v rôznych šaržiach štandardného laboratórneho krmiva líšia (23). Telesná hmotnosť je dôležitou premennou, pretože množstvo skonzumovanej potravy súvisí s telesnou hmotnosťou. Preto sa skutočná dávka fytoestrogénu skonzumovaného z rovnakého krmiva môže v závislosti od druhu zvierat a veku líšiť (9). U nedospelých samíc potkanov môže byť spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti približne dvakrát vyššia ako u mladých dospelých samíc po ovariektómii. U mladých dospelých myši môže byť spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti približne štvornásobne vyššia ako u mladých dospelých samíc potkanov po ovariektómii.
22. Výsledky uterotrofického biologického testu (9)(17)(18)(19) však ukazujú, že obmedzené množstvá fytoestrogénov v krmive sú prijateľné a neznižujú citlivosť biologického testu. Ako usmernenie slúži informácia, že hladiny fytoestrogénov v krmive by u nedospelých samíc potkanov z kmeňa Sprague Dawley a Wistar nemali prekročiť 350 µg ekvivalentov genisteínu/gram laboratórneho krmiva (6)(9). Podobné krmivá by mali byť vhodné aj pri testovaní na mladých dospelých potkanoch po ovariektómii, pretože spotreba potravy v pomere k telesnej hmotnosti je u mladých dospelých jedincov v porovnaní s nedospelými zvieratami nižšia. Ak sa použijú dospelé myši po ovariektómii alebo potkany citlivejšie na fytoestrogény, je potrebné zvážiť proporcionálne zníženie hladiny fytoestrogénu v krmive (20). Okrem toho môžu rozdiely v dostupnej metabolickej energii z rôznych krmív viesť k časovým posunom začiatku puberty (21)(22).
23. Pred začiatkom štúdie je potrebné starostlivo vybrať krmivo bez zvýšenej hladiny fytoestrogénov (pre usmernenie pozri (6)(9)) alebo metabolizovateľnej energie, ktorá môže znehodnotiť výsledky (15)(17)(19)(22)(36). Zabezpečenie primeraného fungovania testovacieho systému použitého v laboratóriu podľa odsekov 26 a 27 predstavuje dôležitú kontrolu obidvoch faktorov. V súlade s dobrou laboratórnou praxou (DLP) by sa mala pre istotu odobrať reprezentatívna vzorka z každej šarže krmiva podávaného počas štúdie na účely prípadnej analýzy obsahu fytoestrogénu (napr. v prípade vysokej hmotnosti kontrolnej matrice v porovnaní s historickými kontrolami alebo v prípade neprimeranej reakcie na referenčný estrogén 17alfa-etinylestradiol). Alikvotné časti by sa mali analyzovať v rámci štúdie alebo zmrazené pri teplote -20 °C alebo takým spôsobom, aby sa zabránilo rozkladu vzorky pred analýzou.
24. Niektoré podstielkové materiály môžu obsahovať prirodzene sa vyskytujúce estrogénne alebo antiestrogénne chemikálie (napríklad je známe, že kukuričný klas ovplyvňuje cyklus u potkanov a podľa všetkého má antiestrogénne účinky). Hladina fytoestrogénov vo vybranej podstielke by mala byť minimálna.

Príprava zvierat

25. Pokusné zvieratá bez známkov akejkoľvek choroby alebo fyzických abnormalít sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Kľetky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Zvieratá sa jednotlivito označia. Nedospelé zvieratá by mali byť počas aklimatizácie umiestnené v kletke so svojimi matkami alebo náhradnými matkami až do odstavenia. Obdobie aklimatizácie pred začatím štúdie by malo u mladých dospelých zvierat a u nedospelých zvierat umiestnených spolu s matkami alebo náhradnými matkami trvať asi 5 dní. Ak sa nedospelé zvieratá získajú ako odstavené mláďatá bez matiek, môže postačovať na aklimatizáciu kratšie obdobie, pretože dávkovanie by sa malo začať okamžite po odstavení (pozri odsek 29).

POSTUP

Overovanie odbornosti laboratória

26. Na overenie odbornosti laboratória sa môžu použiť dve rôzne metódy:
- pravidelné overovanie vychádzajúce z počiatočnej východiskovej pozitívnej kontrolnej štúdie (pozri odsek 27). Aspoň raz za 6 mesiacov a vždy, keď dôjde k zmene, ktorá môže ovplyvniť účinnosť analýzy (napr. nové zloženie krmiva, zmena pracovníkov vykonávajúcich pitvy, zmena kmeňa zvierat alebo zmena dodávateľa atď.), je potrebné overiť citlivosť testovacieho systému (zvierací model) pomocou primeranej dávky (na základe základnej pozitívnej kontrolnej štúdie opísanej v odseku 27) referenčného estrogénu: 17a- etinylestradiol (CAS č. 57-63-6) (EE),
 - použitie súbežných kontrol, pričom súčasťou každého testu bude skupina, ktorej sa bude podávať primeraná dávka referenčného estrogénu.

Ak systém nereaguje podľa očakávania, je potrebné preskúmať a podľa potreby upraviť podmienky testovania. Odporúčaná dávka referenčného estrogénu, ktorá sa má použiť pri obidvoch prístupoch, je približne ED70 až 80.

27. **Východisková pozitívna kontrolná štúdia** – Pred prvým vykonaním štúdie podľa tejto testovacej metódy je potrebné preukázať odbornosť laboratória otestovaním citlivosti zvieracieho modelu, a to stanovením reakcie na dávku referenčného estrogénu 17 α -etinyloestradiol (CAS č. 57-63-6) (EE) minimálne v štyroch dávkach. Reakcia na hmotnosť maternice sa porovná s príslušnými historickými údajmi (pozri odkaz (5)). Ak táto východisková pozitívna kontrolná štúdia neprinesie očakávané výsledky, je potrebné preskúmať a upraviť podmienky testovania.

Počet a stav zvierat

28. Každá pokusná a kontrolná skupina by mala zahŕňať aspoň 6 zvierat (na účely protokolov metódy nedospelých samíc, ako aj metódy dospelých samíc po ovx).

Vek nedospelých zvierat

29. V uterotrofickom biologickom teste s nedospelými zvieratami sa musí presne určiť deň narodenia. Dávkovanie by sa malo začať dostatočne včas s cieľom zabezpečiť, aby na konci podávania testovanej chemikálie nedochádzalo k fyziologickému nárastu endogénnych estrogénov spojenému s pohlavným dospievaním. Na druhej strane však existujú dôkazy, že veľmi mladé zvieratá môžu byť menej citlivé. Pri určovaní optimálneho veku musí každé laboratórium vziať do úvahy svoje vlastné podkladové údaje o dospievaní.

Ako všeobecné usmernenie slúži informácia, že dávkovanie u potkanov sa môže začať ihneď po predčasnom odstavení na 18. postnatálny deň (dátum narodenia je postnatálny deň 0). Dávkovanie by sa u potkanov malo podľa možnosti skončiť na 21. postnatálny deň, v každom prípade však pred 25. postnatálnym dňom, pretože v tomto veku začína byť funkčná os hypotalamus-hypofýza-vaječníky a endogénne hladiny estrogénu môžu začať stúpať spolu s nárastom stredných hodnôt východiskovej hmotnosti maternice a zvýšením počtu štandardných odchýlok v skupine (2)(3)(10)(11)(12).

Postup pri ovariektómii

30. V prípade samíc potkanov a myší po ovariektómii (v pokusných a kontrolných skupinách) by sa ovariektómia mala vykonať vo veku 6 až 8 týždňov. U potkanov by medzi ovariektómiou a prvým dňom podávania malo uplynúť minimálne 14 dní, aby sa umožnila regresia maternice na minimálnu stabilnú východiskovú úroveň. U myší by medzi ovariektómiou a prvým dňom podávania malo uplynúť aspoň 7 dní. Keďže na produkciu významných hladín estrogénov v obehu stačí malé množstvo ovariálneho tkaniva (3), zvieratá by sa mali pred použitím testovať aspoň päť po sebe nasledujúcich dní (napr. medzi 10. - 14. dňom po ovariektómii u potkanov) pozorovaním epitelových buniek získaných výterom z vagíny. Ak zvieratá vykazujú známky začínajúceho estrálneho cyklu, nemali by sa použiť. Neskôr je potrebné pri pitve preskúmať zvyšky po vaječníkoch, aby sa odhalili známky prítomnosti ovariálneho tkaniva. Ak sa preukáže jeho prítomnosť, zviera sa nezarád do výpočtov (3).
31. Postup ovariektómie sa začína po dôkladnej anestézii zvieraťa, keď zviera leží na bruchu. Rez otvárajúci dorzolaterálnu brušnú stenu by mal byť približne 1 cm dlhý a mal by sa začínať v strede medzi spodnou hranicou rebier a lopatou bedrovej kosti, niekoľko milimetrov bočne od laterálneho okraja bedrového svalu. Vaječníky sa odoberú z brušnej dutiny na sterilný podklad. Vaječník sa odpojí v mieste, kde sa vajcovod pripája k telu maternice. Po uistení, že nedochádza k silnému krvácaniu, sa brušná stena zašije a koža uzavrie pomocou šicích svoriek alebo vhodnou sutúrou. Miesta podviazania sú schematicky znázornené na obrázku 1. Použije sa vhodná pooperačná analgézia podľa odporúčania veterinárneho lekára so skúsenosťami so starostlivosťou o hlodavce.

Telesná hmotnosť

32. Pri metóde dospelých samíc po ovariektómii nie je medzi telesnou hmotnosťou a hmotnosťou maternice korelácia, pretože na hmotnosť maternice majú vplyv hormóny ako estrogény, nie však rastové faktory, ktoré regulujú veľkosť tela. Pri metóde nedospelých samíc telesná hmotnosť naopak súvisí s hmotnosťou maternice počas dospievania (34). Pri metóde nedospelých samíc by preto váhové odchýlky u zvierat mali byť minimálne a nemali

by presahovať ± 20 % strednej hmotnosti. To znamená, že chovateľ by mal štandardizovať veľkosť vrhu s cieľom zabezpečiť, aby boli mláďatá rôznych matiek kŕmené približne rovnako. Zvieratá sa rozdelia do skupín (kontrolných a pokusných) na základe náhodného rozloženia hmotnosti tak, že stredná telesná hmotnosť každej skupiny sa od akejkoľvek inej skupiny štatisticky nebude odlišovať. Je potrebné dbať na to, aby do tej istej pokusnej skupiny neboli priradené zvieratá z rovnakého vrhu, podľa možnosti bez navýšenia počtu vrhov potrebných na testovanie.

Dávkovanie

33. Na určenie možného estrogénneho pôsobenia in vivo testovanej chemikálie zvyčajne postačujú dve dávkové skupiny a jedna kontrolná, preto sa tento model uprednostňuje v záujme dobrých životných podmienok zvierat. Ak je cieľom odvodiť krivku závislosti reakcie od dávky alebo extrapolovať nižšie dávky, sú potrebné aspoň 3 dávkové skupiny. Ak sa vyžadujú informácie nad rámec určenia estrogénneho pôsobenia (napríklad odhad účinnosti), je potrebné zvážiť iný dávkový režim. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane rovnaké množstvo nosiča, aké sa použilo v pokusných skupinách (alebo najvyššie množstvo použité v pokusných skupinách, ak sa v jednotlivých skupinách líši).
34. V prípade uterotrofického biologického testu je cieľom vybrať dávky, ktoré zabezpečia prežitie zvierat a ktoré nespôsobujú výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po troch po sebe nasledujúcich dňoch podávania chemikálie na úrovni maximálne 1 000 mg/kg/deň. Pri navrhovaní a výbere úrovni dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike testovanej chemikálie a príbuzných materiálov. Pri určovaní najvyššej dávky sa musí v prvom rade vziať do úvahy úroveň LD50 a/alebo informácie o akútnej toxicite, aby sa predišlo úhynu, ťažkému utrpeniu alebo bolesti zvierat (24)(25)(26). Najvyššia dávka by mala predstavovať maximálnu prípustnú dávku (MTD); prípustná je aj štúdia vykonaná s dávkou, ktorá vyvolala pozitívnu uterotrofickú reakciu. Dlhé intervaly (napr. polovica log jednotiek zodpovedajúcich progresii dávok na úrovni 3,2 alebo až 1 log jednotky) medzi dávkami sú všeobecne prípustné. Ak nie sú k dispozícii žiadne vhodné údaje, môže sa vykonať vyhľadávací test s cieľom stanoviť dávky, ktoré sa použijú.
35. Ak je prípadne možné odhadnúť estrogénnu účinnosť agonistu z údajov in vitro (alebo in silico), môžu sa tieto údaje pri výbere dávky vziať do úvahy. Napríklad množstvo testovanej chemikálie, ktorá by vyvolala uterotrofické reakcie ekvivalentné referenčnému agonistovi (etinylestradiolu), sa odhaduje na základe jej relatívnej účinnosti in vitro na etinylestradiol. Najvyššia testovaná dávka by sa získala vynásobením tejto ekvivalentnej dávky príslušným násobkom, napr. 10 alebo 100.

Úvahy k zisťovaniu rozsahu

36. V prípade potreby sa na niekoľkých zvieratách môže vykonať predbežná štúdia na zistenie rozsahu. V tomto ohľade sa môže použiť usmerňovací dokument OECD č. 19 (25), v ktorom sa vymedzujú klinické príznaky indikujúce toxicitu alebo utrpenie zvierat. Ak je to v rámci tejto štúdie na zistenie rozsahu po troch dňoch podávania možné, maternice sa môžu odobrať a odvážiť približne 24 hodín po poslednej dávke. Tieto údaje môžu potom pomôcť pri plánovaní hlavnej štúdie (pri výbere prijateľnej maximálnej dávky a nižších dávok a odporúčení počtu dávkových skupín).

Podávanie dávok

37. Testovaná chemikália sa podáva orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť dobré životné podmienky zvierat a toxikologické aspekty, ako je význam pre expozíciu na ľudí (napríklad orálna sonda ako simulácia požitia, podkožná injekcia ako simulácia vdýchnutia alebo dermálnej absorpcie), ďalej fyzikálno-chemické vlastnosti testovaného materiálu a najmä existujúce toxikologické informácie a údaje o metabolizme a kinetike (napríklad potreba predísť metabolizmu prvého prechodu, vyššia účinnosť určitého spôsobu expozície).
38. Podľa možnosti sa odporúča zvážiť použitie vodného roztoku/suspenzie. Keďže estrogénne ligandy alebo ich metabolické prekursor sú však väčšinou hydrofóbne, najbežnejším prístupom je použitie roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný, arašidový, sezamový alebo olivový olej). Tieto oleje však majú rôzny obsah kalórií a tuku, preto by nosič mohol ovplyvniť príjem metabolizovateľnej energie (ME) a hlavne pri metóde nedospelých samíc by potenciálne mohol viesť k zmene nameraných parametrov, ako je napríklad hmotnosť maternice (33). Pred začiatkom štúdie je preto potrebné každý nosič, ktorý sa použije, testovať použitím kontrol bez nosičov. Testovanú chemikáliu možno rozpustiť v minimálnom množstve etanolu s koncentráciou 95 % alebo v inom vhodnom

rozpúšťadla a zriediť na konečné pracovné koncentrácie v testovacom nosiči. Toxické vlastnosti rozpúšťadla musia byť známe a musia sa testovať v samostatnej kontrolnej skupine určenej výhradne na testovanie rozpúšťadla. Ak je testovaná chemikália stabilná, môže sa pri jej rozpúšťaní použiť jemné ohrievanie a intenzívne mechanické pôsobenie. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči. Ak je testovaná chemikália stabilná počas celého trvania štúdie, môže sa pripraviť jeden počiatočný alikvotný podiel testovanej chemikálie a uvedené dávkové riedenia sa môžu pripravovať denne.

39. Časový harmonogram dávkovania bude závisieť od použitého modelu (pozri odsek 29 pre model nedospelých samíc a odsek 30 pre model dospelých samíc po ovariektómii). Nedospelým samiciam potkanov sa podáva dávka testovanej chemikálie denne tri po sebe nasledujúce dni. Trojdňové podávanie sa odporúča aj u samíc potkanov po ovariektómii, ale prípustné sú aj dlhšie expozície, ktoré môžu pomôcť pri určovaní slabých aktívnych chemikálií. U samíc myší po ovariektómii by malo stačiť podávanie počas 3 dní, pričom v prípade silných estrogénnych agonistov neprinesie predĺženie podávania na sedem dní žiadnu významnú výhodu, vo validačnej štúdii sa však tento vzťah nepreukázal v prípade slabých estrogénov (16), preto by sa dávkovanie malo u dospelých myší po ovariektómii predĺžiť na 7 po sebe nasledujúcich dní. Dávku je potrebné podávať približne v rovnakom čase každý deň. Čas podávania dávky sa podľa potreby upraví s cieľom udržiavať konštantnú úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (napríklad mg testovanej chemikálie na kg telesnej hmotnosti za deň). Pokiaľ ide o aplikovaný objem, jeho variabilita na základe telesnej hmotnosti sa minimalizuje upravením koncentrácie dávkového roztoku s cieľom zabezpečiť konštantný objem v pomere k telesnej hmotnosti pri všetkých úrovniach dávok a pre všetky spôsoby podávania.
40. Ak je testovaná chemikália podávaná cez trubicu, musí sa to realizovať v jednej dennej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Je potrebné postupovať podľa miestnych usmernení k starostlivosti o zvieratá, objem by však nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti.
41. V prípade podávania testovanej chemikálie pomocou podkožnej injekcie sa chemikália podáva v jednej dennej dávke. Dávky sa vpichujú v oblasti medzi lopatkami alebo v krížovej oblasti pomocou sterilnej ihly (napríklad veľkosť 23 G alebo 25 G) a tuberkulínovej striekačky. Oholenie miesta vpichu nie je povinné. Je potrebné zaznamenať všetky straty, únik na mieste vpichu alebo neúplné podanie dávky. Celkový denný vpichnutý objem na potkana by nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti rozdelených do 2 vpichov s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti.

Pozorovania

Všeobecné a klinické pozorovania

42. Všeobecné klinické pozorovania je potrebné vykonávať aspoň raz denne a v prípade zistenia známk toxicity častejšie. Pozorovania sa podľa možnosti vykonávajú v rovnakom čase (časoch) každý deň a so zreteľom na obdobie najvyšších očakávaných účinkov po dávkovaní. U všetkých zvierat sa sleduje úmrtnosť, chorobnosť a všeobecné klinické príznaky, ako napríklad zmeny v správaní, na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreníc, nezvyčajné dýchanie).

Telesná hmotnosť a spotreba potravy

43. Všetky zvieratá sa musia denne vážiť s presnosťou na 0,1 g, pričom prvé váženie sa vykoná tesne pred začatím testu, t. j. pri rozdeľovaní zvierat do skupín. Nepovinne možno merať množstvo potravy spotrebovanej počas testu, a to vážením krmidiel v každej kletke. Výsledky spotreby potravy sa vyjadria v gramoch na potkana na deň.

Pitva a meranie hmotnosti maternice

44. Dvadsaťštyri hodín po poslednom podaní dávky sa potkany humánne usmrčia. Ak je to možné, zvolí sa náhodné poradie pitiev zvierat zo všetkých skupín, aby sa predišlo priamemu postupu jedným alebo druhým smerom podľa dávkových skupín, čo by mohlo mierne ovplyvniť údaje. Cieľom biologického testu je zmerať hmotnosť maternice v mokrom aj vysušenom stave. Mokrá hmotnosť zahŕňa maternicu a obsah tekutín z lúmenu. Vysušená hmotnosť sa meria po vytlačení a odstránení obsahu lúmenu z maternice.

45. Pred pitvou sa u nedospelých zvierat vyšetrí stav otvárania vagíny. Pitva sa začína otvorením brušnej steny pri začiatku lonovej spony. Následne sa od dorzálnej brušnej steny oddelia rohy maternice a vaječníky, ak sú prítomné. Močový mechúr a močovody sa odstránia z ventrálnej a laterálnej strany maternice a vagíny. Fibrózne zrasty medzi konečníkom a vagínou sa oddelí, až kým nie je možné identifikovať spojenie vaginálneho otvoru a kože perinea. Maternica a vagína sa od tela oddelia prerezaním vaginálnej steny tesne nad spojením kože perinea, ako je znázornené na obrázku 2. Maternica sa od steny tela oddelí jemným prerezaním maternicového okružia v bode, kde je pripojená k dorzolaterálnej strane jednotlivých rohov maternice po celej ich dĺžke. Po odobratí maternice z tela sa s ňou musí manipulovať dostatočne rýchlo, aby sa predišlo vysychaniu tkanív. Pri malých tkanivách, ako je maternica, je strata hmotnosti z dôvodu vysychania ešte závažnejšia (23). Ak sú prítomné vaječníky, odstránia sa pri vajcovodoch, pričom sa zabráni strate tekutiny z lúmenu maternicového rohu. Ak zviera podstúpilo ovariectómiu, preskúma sa, či zvyšky po vaječníkoch neobsahujú ovariálne tkanivo. Prebytočný tuk a spojivé tkanivá sa odstránia. Vagina sa oddelí od maternice tesne pod krčkom maternice tak, aby krčok maternice zostal pripojený k telu maternice, ako je znázornené na obrázku 2.
46. Každá maternica sa premiestni do jednotlivo označenej a odváženej nádoby (napr. Petriho miska alebo plastová lodička na váženie), pričom sa naďalej dbá na to, aby sa predišlo vysychaniu pred vážením (napríklad sa do nádoby môže vložiť filtračný papier mierne navlhčený slaným roztokom). Maternica s tekutinou z lúmenu sa odváži s presnosťou na 0,1 mg (mokrú hmotnosť maternice).
47. Každá maternica sa následne jednotlivo spracuje s cieľom odstrániť tekutinu z lúmenu. Obidva rohy maternice sa prepichnú alebo pozdĺžne narežú. Maternica sa položí na mierne navlhčený filtračný papier (napr. Whatman č. 3) a jemne sa stláča pomocou ďalšieho mierne navlhčeného filtračného papiera s cieľom úplne odstrániť tekutinu z lúmenu. Po odstránení obsahu lúmenu sa maternica odváži s presnosťou na 0,1 mg (vysušená hmotnosť maternice).
48. Na základe hmotnosti maternice na konci štúdie možno potvrdiť, že nebol prekročený primeraný vek u nedospelých neporušených potkanov, v tomto ohľade sú ale rozhodujúce historické údaje o kmeni potkanov, ktoré laboratórium použilo (pozri odsek 56 pre interpretáciu výsledkov).

Nepovinné vyšetrenia

49. Maternica sa po odvážení môže fixovať v 10 % neutrálnom tlmivom roztoku formalínu, aby sa po farbení hematoxylínom a eozínom (HE) mohla histopatologicky vyšetriť. Zodpovedajúcim spôsobom sa môže vyšetriť aj vagina (pozri odsek 9). Okrem toho sa pre kvantitatívne porovnanie môže vykonať morфометrické meranie endometriálneho epitelu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

50. Údaje zo štúdie by mali zahŕňať:
- počet zvierat na začiatku testu,
 - počet a identifikáciu zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, a dátum a čas každého uhynutia alebo humánneho usmrtenia,
 - počet a identifikáciu zvierat, ktoré vykazujú známky toxicity, a popis zistených známk toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti toxických účinkov a
 - počet a identifikáciu zvierat, ktoré vykazujú akékoľvek poškodenia, a popis typu poškodení.
51. V rámci údajov o jednotlivých zvieratách sa zaznamená telesná hmotnosť, mokrú hmotnosť maternice a vysušená hmotnosť maternice. Na zistenie, či podávanie testovanej chemikálie spôsobilo štatisticky významné zvýšenie ($p < 0,05$) hmotnosti maternice, sa použijú jednostranné štatistické analýzy agonistov. Na vyšetrenie zmien mokrej a vysušenej hmotnosti maternice súvisiacich s podávaním testovanej chemikálie sa vykonajú primerané štatistické analýzy. Údaje sa napríklad môžu hodnotiť pomocou prístupu analýzy kovariancie (ANCOVA) s využitím telesnej hmotnosti pri pitve ako spolupremennej. Pred vykonaním analýzy údajov sa údaje o maternici môžu podrobiť logaritmickému transformácii na stabilizáciu rozptylu. Na párové porovnania každej dávkovej skupiny s kontrolami nosiča a na výpočet intervalov spoľahlivosti je vhodný Dunnettov a Hsuov test. Na zistenie

možných odľahlých hodnôt a posúdenie homogenity rozptylov sa môžu použiť grafy studentizovaných rezíduí. Tieto postupy boli použité vo validačnom programe OECD, v rámci ktorého sa použil PROC GLM v systéme štatistickej analýzy (SAS Institute, Cary, NC), verzia 8 (6)(7).

52. Záverečná správa musí obsahovať:

Testovacie zariadenie:

- zodpovední pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,
- údaje z východiskového pozitívneho kontrolného testu a údaje z periodických pozitívnych kontrol (pozri odsek 26 a 27).

Testovaná chemikália:

- charakteristika testovaných chemikálií,
- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- spôsob a periodicita prípravy roztokov,
- všetky získané údaje o stabilite,
- všetky analýzy dávkovacích roztokov.

Nosič:

- charakteristika testovaného nosiča (povaha, dodávateľ a séria),
- odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Pokusné zvieratá:

- druh, kmeň a odôvodnenie ich výberu,
- dodávateľ a konkrétne zariadenie dodávateľa,
- vek v čase dodania s dátumom narodenia,
- v prípade nedospelých zvierat údaj o tom, či boli dodané s matkou alebo s náhradnou matkou, a dátum odstavenia,
- údaje o aklimatizácii zvierat,
- počet zvierat na kletku,
- údaje a metóda označovania jednotlivých zvierat a skupín.

Podmienky testu:

- údaje o postupe randomizácie (t. j. použitá metóda),
- odôvodnenie výberu dávky,
- údaje o zložení testovanej chemikálie, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogénnosti,
- údaje o podávaní testovanej chemikálie a odôvodnenie výberu spôsobu expozície,
- krmivo (názov, typ, dodávateľ a hladiny fytoestrogénu, ak sú známe),
- zdroj vody (napríklad voda z vodovodu alebo filtrovaná voda) a dodávanie (prívodom z veľkej nádoby, vo fľašiach, atď.),
- podstielka (názov, typ, dodávateľ, obsah),
- záznam podmienok umiestnenia v kliebkach, interval osvetlenia, teplota a vlhkosť v miestnosti, čistenie miestnosti,
- podrobný opis pitvy a postupov váženia maternice,
- opis štatistických postupov.

*Výsledky**Pre jednotlivé zvieratá:*

- všetky jednotlivé denné telesné hmotnosti (od rozdelenia do skupín po pitvu) (s presnosťou na 0,1 g),
- vek každého zvieratá (uvádza sa v dňoch, deň narodenia sa počíta ako deň 0) na začiatku podávania testovanej chemikálie,
- dátum a čas každého podania dávky,
- výpočet podaného množstva a dávkovania a všetky pozorované straty v dávkach počas ich podania alebo po ich podaní,
- denný záznam o stave zvieratá vrátane relevantných príznakov a pozorovaní,
- predpokladaná príčina smrti (ak sa zviera počas štúdie našlo v moribundnom stave alebo uhynuté),
- dátum a čas humánneho usmrtenia a časový interval do posledného podania dávky,
- mokrá hmotnosť maternice (s presnosťou na 0,1 mg) a všetky pozorované straty tekutín z lúmenu počas pitvy a prípravy na váženie,
- vysušená hmotnosť maternice (s presnosťou na 0,1 mg),

Pre každú skupinu zvierat:

- denné stredné telesné hmotnosti (s presnosťou na 0,1 g) a štandardné odchýlky (od rozdelenia do skupín po pitvu),
- stredné mokré hmotnosti maternice a stredné vysušené hmotnosti maternice (s presnosťou na 0,1 mg) a štandardné odchýlky,
- denná spotreba potravy, ak sa merala (vypočítaná na gramy potravy spotrebované na jedno zviera),
- výsledky štatistických analýz porovnávajúcich tak mokré, ako aj vysušené hmotnosti materníc z pokusných skupín vzhľadom na rovnaké merania v kontrolných skupinách nosiča,
- výsledky štatistických analýz porovnávajúcich celkovú telesnú hmotnosť a nárast telesnej hmotnosti u pokusných skupín vzhľadom na rovnaké merania v kontrolných skupinách nosiča.

53. Súhrn dôležitých usmerňujúcich faktov testovacej metódy

	Potkany	Myši
Zvieratá		
Kmeň	Bežne používané laboratórne kmene hlodavcov	
Počet zvierat	Minimálne 6 zvierat z každej dávkovej skupiny	
Počet skupín	Minimálne 2 pokusné skupiny (pre usmernenie pozri odsek 33) a negatívna kontrolná skupina Usmernenia k pozitívnym kontrolným skupinám sú uvedené v odseku 26 a 27	
Podmienky umiestnenia a kŕmenia		
T ^o v miestnosti so zvieratami	22 °C ± 3 °C	
Relatívna vlhkosť	50-60 %, minimálne 30 % a maximálne 70 %	
Denný svetelný cyklus	12 hodín svetla, 12 hodín tmy	
Potrava a pitná voda	Ad libitum	

	Potkany	Myši
Umiestnenie	Jednotlivo alebo v skupinách do troch zvierat (u nedospelých zvierat sa odporúča umiestnenie v sociálnych skupinách)	
Krmivo a podstielka	Odporúča sa nízka hladina fytoestrogénov v krmive a podstielke	

Protokol

Metóda	Metóda nedospelých samíc bez ovariectómie (uprednostňuje sa). Metóda dospelých samíc po ovariectómii	Metóda dospelých samíc po ovariectómii
Vek vhodný pre dávkovanie u nedospelých zvierat	Nie skôr ako 18. PND. Dávkovanie by sa malo ukončiť pred 25. PND	Neuplatňuje sa v rozsahu pôsobnosti súčasnej testovacej metódy
Vek vhodný na ovariectómiu	Vo veku medzi 6 až 8 týždňom	
Vek vhodný pre dávkovanie u zvierat po ovariectómii	Medzi vykonaním ovariectómie a prvým dňom podávania by malo uplynúť minimálne 14 dní	Medzi vykonaním ovariectómie a prvým dňom podávania by malo uplynúť minimálne 7 dní
Telesná hmotnosť	Odchýlky telesnej hmotnosti by mali byť minimálne a nemali by presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti	

Dávkovanie

Spôsob podávania	Orálnou sondou alebo podkožnou injekciou	
Frekvencia podávania	Jedna denná dávka	
Objemové množstvo na sondu a injekciu	≤ 5 ml/kg telesnej hmotnosti (alebo do 10 ml/kg telesnej hmotnosti v prípade vodných roztokov) (v 2 miestach vpichu v prípade podkožnej injekcie)	
Dĺžka podávania	3 po sebe nasledujúce dni v prípade modelu nedospelých samíc Najmenej 3 po sebe nasledujúce dni v prípade modelu dospelých samíc po OVX	7 po sebe nasledujúcich dní v prípade modelu dospelých samíc po OVX
Čas pitvy	Približne 24 hodín po poslednej dávke	

Výsledky

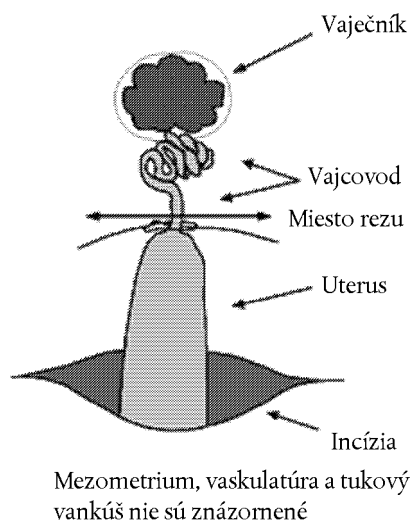
Pozitívna reakcia	Štatisticky významný nárast strednej hmotnosti maternice (mokrú a/alebo vysušenú hmotnosť)
Referenčný estrogén	17 α -etinyloestradiol

USMERNENIE PRE INTERPRETÁCIU A UZNÁVANIE VÝSLEDKOV

54. Vo všeobecnosti sa test estrogénnych účinkov považuje za pozitívny, ak dôjde k štatisticky významnému zvýšeniu hmotnosti maternice ($p < 0,05$) prinajmenšom pri vysokej úrovni dávky v porovnaní s kontrolnou skupinou, v ktorej bolo použité rozpúšťadlo. O pozitívnom výsledku ďalej svedčí preukázanie biologicky vierohodného vzťahu medzi dávkou a rozsahom reakcie po zohľadnení skutočnosti, že prekrývajúce sa estrogénne a antiestrogénne účinky testovanej chemikálie môžu ovplyvniť tvar krivky závislosti reakcie od dávky.
55. V záujme zabezpečenia zmysluplnej interpretácie údajov je potrebné dbať na to, aby sa neprekročila maximálna prípustná dávka. Zníženie telesnej hmotnosti, klinické príznaky a ďalšie nálezy sa musia v tejto súvislosti dôkladne posúdiť.

56. Dôležitým faktorom pre uznanie údajov z uterotrofického biologického testu sú hmotnosti materníc v kontrolnej skupine, ktorej bol podaný nosič. Vysoké kontrolné hodnoty môžu ohroziť citlivosť biologického testu a schopnosť odhaliť veľmi slabých estrogénnych agonistov. Odborná literatúra a údaje získané počas validácie uterotrofického biologického testu naznačujú, že občas môžu spontánne nastať prípady vysokých kontrolných priemerných hodnôt, najmä u nedospelých zvierat (2)(3)(6)(9). Keďže hmotnosť maternice u nedospelých potkanov závisí od mnohých premenných, ako je napríklad kmeň alebo telesná hmotnosť, nie je v prípade hmotnosti maternice možné uviesť konečný horný limit. Pre kontrolu, ak sa vysušená hmotnosť maternice u nedospelých kontrolných potkanov pohybuje medzi 40 a 45 mg, treba tieto výsledky považovať za podozrivé, a hmotnosť maternice nad 45 mg môže viesť k opakovaniu testu. Je však potrebné posudzovať jednotlivé prípady (3)(6)(8). Pri testovaní dospelých potkanov po neúplnej ovariektómii môže ovariálne tkanivo produkovať endogénny estrogén a spomaliť regresiu hmotnosti maternice.
57. Vysušená hmotnosť maternice u kontrolného nosiča nižšia ako 0,09 % telesnej hmotnosti nedospelých samíc potkana a nižšia ako 0,04 % v prípade mladých dospelých samíc, ktoré podstúpili ovariektómiu, môže podľa všetkého viesť k prijateľným výsledkom [pozri tabuľku 31 (2)]. Ak je kontrolná hmotnosť materníc vyššia ako tieto hodnoty, je potrebné skontrolovať rôzne faktory, ako je vek zvierat, riadne vykonaná ovariektómia, fytoestrogény v potrave atď. a s výsledkom negatívneho testu (žiadna indikácia estrogénnej aktivity) treba narábať opatrne.
58. Historické údaje o kontrolných skupinách, ktorým sa podal nosič, sa uchovávajú v laboratóriu. V laboratóriu sa uchovávajú aj historické údaje o reakciách na pozitívne referenčné estrogény, ako je 17 α -etinylestradiol. Laboratóriá môžu tiež testovať reakciu na známych slabých estrogénnych agonistoch. Všetky tieto údaje možno v záujme zabezpečenia dostatočnej citlivosti metód laboratória porovnať s dostupnými údajmi (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).
59. V priebehu validačnej štúdie OECD sa ukázalo, že vysušená hmotnosť maternice má nižšiu variabilitu ako mokrá hmotnosť maternice (6)(7). Významná reakcia pri ktoromkoľvek meraní by však indikovala, že testovaná chemikália má vplyv na estrogénnu aktivitu.
60. Uterotrofická reakcia nemá celkom estrogénny pôvod, pozitívny výsledok uterotrofického biologického testu by sa však vo všeobecnosti mal interpretovať ako dôkaz estrogénneho potenciálu in vivo a mal by iniciovať kroky, ktoré by viedli k ďalšiemu objasneniu (pozri odsek 9 a „Konceptný rámec OECD k testovaniu a hodnoteniu endokrinných disruptorov“, príloha 2).

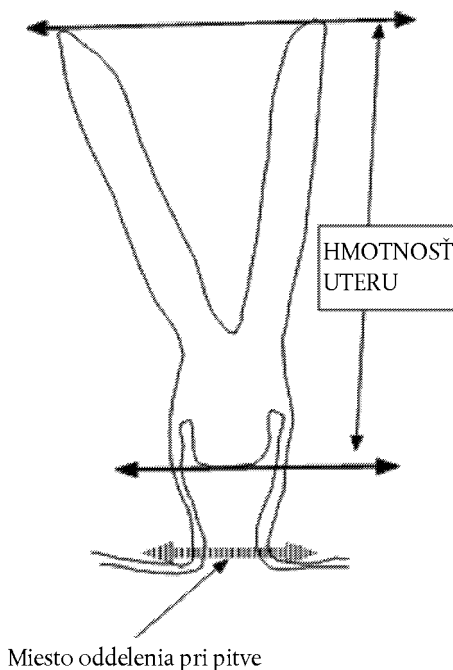
Obrázok 1

Schematický diagram znázorňujúci chirurgické odstránenie vaječníkov

Postup sa začína otvorením dorzolaterálnej brušnej steny v strede medzi spodnou hranicou rebier a lopatou bedrovej kosti a niekoľko milimetrov bočne od laterálneho okraja bedrového svalu. V brušnej dutine sú umiestnené vaječníky. Na aseptickú oblasť sa následne vaječníky fyzicky odstránia z brušnej dutiny, medzi vaječník

a maternicu sa uviaže obvaz na zastavenie krvácania a vaječník sa vyreže nad obvazom v mieste, kde sa vajcovod pripája k jednotlivým rohom maternice. Po uistení, že nedochádza k žiadnemu krvácaniu, sa brušná stena zašije a koža uzavrie, napr. pomocou šicích svoriek alebo stehov. Predtým, ako sa zvieratá použijú, sa im umožní, aby sa najmenej po dobu 14 dní zotavili a aby maternica nadobudla pôvodnú hmotnosť.

Obrázok 2

Odstránenie a príprava maternicových tkanív na váženie

Postup sa začína otvorením brušnej steny pri lonovej spony. Následne sa každý vaječník, ak je prítomný, a roh maternice oddelí od dorzálnej brušnej steny. Močový mechúr a močovody sa odstránia z ventrálnej a laterálnej strany maternice a vagíny. Fibrózne zrasty medzi konečníkom a vagínou sa oddelí, až kým nie je možné identifikovať spojenie vaginálneho otvoru a kože perinea. Maternica a vagína sa od tela oddelia prerezaním vaginálnej steny tesne nad spojením kože perinea, ako je znázornené na obrázku. Maternica sa od steny tela oddelí jemným prerezaním maternicového okružia v bode, kde je pripojená k dorzolaterálnej strane jednotlivých rohov maternice po celej ich dĺžke. Po odstránení z tela sa odreže prebytočný tuk a spojivové tkanivo. Ak sú prítomné vaječníky, odstránia sa pri vajcovodoch, pričom sa zabráni strate tekutiny z lúmenu maternicového rohu. Ak zviera podstúpilo ovariectómiu, preskúma sa, či zvyšky po vaječníkoch neobsahujú ovariálne tkanivo. Vagína sa oddelí od maternice tesne pod krčkom maternice tak, aby kľúčok maternice zostal pripojený k telu maternice, ako je znázornené na obrázku. Maternicu možno následne odvážiť.

Dodatok 1

VYMEDZENIA POJOMOV

Antiestrogénny účinok je schopnosť chemikálie potlačiť pôsobenie 17β -estradiolu na organizmus cicavca.

Chemikália je látka alebo zmes.

Dátum narodenia je postnatálny deň 0.

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. V prípade uterotrofického biologického testu sa dávka vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvierťa na deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň).

Maximálna prípustná dávka (MTD) je najväčšie množstvo chemikálie, ktorá po zavedení do tela pokusné zvieratá nezabije (označovaná ako LD₀) (IUPAC, 1993).

Estrogénny účinok je schopnosť chemikálie pôsobiť ako 17β -estradiolu v organizme cicavcov.

Postnatálny deň X je X-tý deň života po dni narodenia.

Citlivosť je podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy.

Špecifickosť je podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy.

Testovaná chemikália znamená akúkoľvek látku alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Uterotrofický je pojem používaný na opísanie pozitívneho vplyvu na rast maternicových tkanív.

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a významu pre konkrétny účel.

Poznámka: Dokument vypracoval Sekretariát programu na vypracovanie pokynov k testovaniu na základe dohody zo 6. zasadnutia pracovnej skupiny EDTA

Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov

Úroveň 1 Triedenie a určovanie priorít podľa dostupných informácií	— fyzikálne a chemické vlastnosti napr. MW, reaktivita, volatilita, biodegradabilita, — expozícia ľudí a životného prostredia napr. objem výroby, uvoľňovanie, spôsoby použitia — riziko napr. dostupné toxikologické údaje
Úroveň 2 <i>In vitro</i> skúšky poskytujúce mechanistické údaje	— väzobná afinita receptorov ER, AR, TR — transkripčná aktivácia — aromatáza a steroidogenéza <i>in vitro</i> — rozpoznávanie/viazanie Ah receptoru — QSAR metodiky — vysoko výkonný predbežný skrining (HTPS) — funkcia štítnej žľazy — VTG (vitelogenínová) skúška na rybách hepatocytoch — iné (podľa potreby)
Úroveň 3 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o samostatných endokrinných mechanizmoch a vplyvoch	— uterotrofský skúška (estrogénová súvislosť) — Hershbergerov test (androgénová súvislosť) — nereceptorová hormonálna funkcia — iné (napr. štítne žľazy) — VTG (vitelogenínová) skúška u rýb (estrogénová súvislosť)
Úroveň 4 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o viacnásobných endokrinných mechanizmoch a vplyvoch	— skúška OECD 407 rozšírená (sledované parametre založené na endokrinných mechanizmoch) — skúšky na pubertálnych samcoch a samiciach — skúška na intaktných dospelých samcoch — skúška gonadálnej histopatológie u rýb — skúška metamorfózy u žiab
Úroveň 5 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o vplyvoch endokrinných a iných mechanizmov	— 1-generačná skúška (TG41 5 rozšírená)¹ — 2-generačná skúška (TG41 6 rozšírená)¹ — reprodukčný skriningový test (TG421 rozšírený)¹ — kombinovaný 28 dňový/reprodukčný skriningový test (TG 422 enhanced)¹ — skúšky počas celého a čiastočného životného cyklu u rýb, vtákov, obojživelníkov a bezstavovcov (vývoja reprodukcia) ¹ Ďalšie možné rozšírenia a posúdi VMG mamm

VMG mamm: Skupina pre riadenie validácie testovania a posudzovania cicavcov

POZNÁMKY K RÁMCU:

- Poznámka 1:* Vstup na všetkých úrovniach a výstup na všetkých úrovniach je možný a závisí od povahy existujúcich informačných potrieb na účely posúdenia nebezpečnosti a rizík.
- Poznámka 2:* Na úrovni 5 by ekotoxikológia mala zahŕňať sledované parametre, ktoré indikujú mechanizmy nepriaznivých účinkov a potenciálne poškodenie populácie.
- Poznámka 3:* Ak multimodálny model zahŕňa viacero testov jedného sledovaného parametra, daný model nahradí používanie týchto testov jedného sledovaného parametra.
- Poznámka 4:* Každá chemikália by sa mala posudzovať jednotlivo po zohľadnení všetkých dostupných informácií a so zreteľom na funkciu rámcových úrovní.
- Poznámka 5:* Rámec sa v súčasnosti nepovažuje za úplný. Na úrovniach 3, 4 a 5 zahŕňa testy, ktoré sú buď dostupné, alebo u ktorých prebieha validácia. Pokiaľ ide o testy, u ktorých prebieha validácia, sú zahrnuté predbežne. Po vypracovaní a validácii sa formálne pridávajú do rámca.
- Poznámka 6:* Úroveň 5 zahŕňa aj iné ako konečné testy. Testy zahrnuté do tejto úrovne majú prispieť k všeobecnému posúdeniu nebezpečnosti a rizík.

LITERATÚRA

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. -11. marec 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 JW, 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 WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (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 MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650 - 651.
14. Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, 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 JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, 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 Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
17. Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
18. Wade MG, 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 JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, 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 AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343 - 347.
22. Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381 - 393.
23. Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (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.
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, Paríž.
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 AN, Bickoff EM and Kohler GO. (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 Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
38. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

B.55. HERSHBERGEROV BIOLOGICKÝ TEST U POTKANOV: KRÁTKODOBÝ SKRÍNINGOVÝ TEST NA (ANTI)ANDROGÉNNÉ VLASTNOSTI

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 441 (2009). Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia a vypracovať nové usmernenia na vykonávanie testov potenciálnych endokrinných disruptorov (1). Súčasťou tejto činnosti bolo vypracovať usmernenie na vykonávanie Hershbergerovho biologického testu u potkanov. Vo farmaceutickom priemysle sa tento test používal niekoľko desiatok rokov a odborný výbor ho prvýkrát normalizoval v roku 1962 ako nástroj skríningu androgénnych chemikálií (2). V rokoch 2001 – 2007 prešiel Hershbergerov biologický test u potkanov rozsiahlym validačným programom, ktorý zahŕňal vypracovanie podkladového kontrolného dokumentu (23), zostavenie podrobnej dokumentácie metód (3), vypracovanie príručky pre pitvy (21) a vykonanie rozsiahlych intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdií, ktoré preukazujú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť biologického testu. Tieto validačné štúdie boli vykonané na silnom referenčnom androgéne (testosterón propionát (TP)), dvoch silných syntetických androgénoch (trenbolón-acetát a metyl-testosterón), silnom antiandrogénom liečive (flutamid), silnom inhibítore syntézy (finasterid) prírodného androgénu (dihydrotestosterón-DHT), niekoľkých slabých antiandrogénnych pesticídov (linuron, vinklozólín, procymidón, p,p' DDE), silnom inhibítore 5 α -reduktázy (finasterid) a dvoch známych negatívnych chemikáliách (dinitrofenol a nonylfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Táto testovacia metóda je výsledkom dlhodobých minulých skúseností s biologickým testom, skúseností nadobudnutých v priebehu programu validácie testu a výsledkov, ktoré tento test priniesol.
2. Hershbergerov biologický test je krátkodobý skríningový test in vivo založený na použití akcesórnych tkanív samčej rozmnožovacej sústavy. Test vznikol v 30. rokoch 20. storočia a v 40. rokoch bol upravený s cieľom rozšíriť jeho aplikáciu aj na svaly samčej rozmnožovacej sústavy, ktoré sú citlivé na androgény (2) (9 - 15). V 60. rokoch sa pomocou štandardizovanej verzie protokolu vyhodnotilo viac ako 700 možných androgénov (2) (14) a použitie testu na androgény aj na antiandrogény sa v tomto období považovalo za štandardnú metódu (2) (15). Súčasný biologický test je založený na zmenách hmotnosti piatich tkanív, ktoré sú podmienené účinkom androgénov, u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana. Posudzuje schopnosť chemikálie vyvolať biologickú aktivitu zodpovedajúcu androgénnym agonistom, antagonistom alebo inhibítom 5 α -reduktázy. Piatimi cieľovými tkanivami, ktoré sú podmienené účinkom androgénov, zaradenými do tejto testovacej metódy sú ventrálna prostata (VP), semenný mechúrnik (SV) (vrátane tekutín a koagulačných žliaz), zdvihač konečníka spolu s bulbokavernóznymi svalmi (LABC), párové Cowperove žľazy (COW) a žalud' (GP). V týchto piatich tkanivách sa u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana reakcia na pôsobenie androgénov prejavuje ako zvýšenie absolútnej hmotnosti. Keď sa u týchto tkanív stimuluje zvýšenie hmotnosti podaním silného referenčného androgénu, reakcia všetkých piatich tkanív na podanie antiandrogénov sa prejaví znížením absolútnej hmotnosti. Primárny model Hershbergerovho biologického testu používa chirurgicky kastrovaných peripubertálnych samcov a bol validovaný vo fáze 1, 2 a 3 programu validácie Hershbergerovho testu.
3. Hershbergerov biologický test slúži ako mechanistický skríningový test androgénnych agonistov, androgénnych antagonistov a inhibítom 5 α -reduktázy in vivo a jeho použitie je potrebné posudzovať v kontexte 'Konceptného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov' (dodatok 2). V tomto konceptnom rámci je Hershbergerov biologický test zahrnutý do úrovne 3 ako test in vivo poskytujúci údaje o jednom endokrinnom mechanizme, t. j. (anti)androgénnych účinkoch. Mal by sa zaradiť do skupiny testov in vitro a in vivo, ktorých cieľom je identifikovať chemikálie s potenciálnym pôsobením na endokrinný systém a v konečnom dôsledku posúdiť riziká pre ľudské zdravie alebo životné prostredie.

4. V záujme dobrých životných podmienok zvierat s cieľom vyhnúť sa kastročnému zákroku bola snaha vymyslieť alternatívny model Hershbergerovho biologického testu, ktorým bolo použitie intaktných (nekastrovaných) stimulovaných odstavených samcov. Testovacia metóda stimulovaných odstavených samcov prešla validačným postupom (24), z validačných štúdií však vyplynulo, že pri použití modelu Hershbergerovho biologického testu s odstavenými samcami nie je možné pri testovaných dávkach zo slabých antiandrogénov konzistentne určiť účinky androgénov na hmotnosť orgánov. Model preto do tejto testovacej metódy nebol zahrnutý. Uznáva sa však, že jeho použitie je nielen prínosom pre dobré životné podmienky zvierat, ale môže zároveň priniesť informácie o iných mechanizmoch pôsobenia, preto sa tento model uvádza v usmerňovacom dokumente OECD č. 115 (25).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Androgénni agonisti a antagonisti pôsobia ako ligandy na androgénne receptory, pričom agonisti môžu aktivovať a antagonisti inhibovať transkripciu génov, ktorú riadi receptor. Okrem toho niektoré chemikálie inhibujú premenu testosterónu na silnejší prírodný androgén dihydrotestosterón v niektorých cieľových androgénnych tkanivách (inhibítory 5 α -reduktázy). Takéto chemikálie majú potenciál viesť k nepriaznivým zdravotným rizikám vrátane účinkov na rozmnožovanie a vývoj. Existuje preto regulačná potreba rýchleho posudzovania a hodnotenia chemikálií ako možných androgénnych agonistov alebo antagonistov alebo ako inhibítorov 5 α -reduktázy. Afinita ligandu pre androgénny receptor meraná väzbou na receptor alebo transkripčná aktivácia reportérových génov in vitro nie je jediným faktorom poukazujúcim na možné riziko, hoci má iba informatívnu hodnotu. Ďalšie faktory môžu zahŕňať metabolickú aktiváciu a deaktiváciu pri vstupe do tela, chemickú distribúciu do cieľových tkanív a odstránenie z tela. Vzniká preto potreba testovať možné pôsobenie chemikálie in vivo za relevantných podmienok a expozície. Potreba hodnotenia in vivo je menej naliehavá, ak sú známe chemické vlastnosti týkajúce sa vzťahu absorpcie – distribúcie – metabolizmu – eliminácie (ADME). Tkanivá podmienené účinkom androgénov reagujú, najmä u kastrovaných peripubertálnych samcov potkana, na stimuláciu androgénmi rýchlym a intenzívnym rastom. Hlodavce, najmä potkany, sa takisto všeobecne používajú v štúdiách toxicity na charakterizáciu rizika. Preto je model analýzy, v ktorom sa používajú kastrované peripubertálne potkany a päť cieľových tkanív, vhodný na in vivo testovanie androgénnych agonistov, antagonistov a inhibítorov 5 α -reduktázy.
6. Táto testovacia metóda je založená na protokoloch použitých pri validačnej štúdii OECD, ktoré sa v intralaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách ukázali ako spoľahlivé a opakovateľné (4)(5)(6)(7)(8). V tejto testovacej metóde sa uvádzajú postupy pre androgény aj antiandrogény.
7. Hoci sa v programe OECD pre validáciu Hershbergerovho biologického testu vyskytli v rôznych laboratóriách určité rozdiely medzi dávkami testosterón-propionátu (TP) použitými na detekciu antiandrogénov (0,2 verus 0,4 mg/kg/d, podkožnou injekciou), tieto dva rôzne protokoly sa nelíšili schopnosťou detekcie slabého alebo silného antiandrogénneho pôsobenia. Je však zrejmé, že dávka TP nesmie byť príliš vysoká, aby neblokovala účinky slabých antagonistov androgénnych receptorov (AR), ani príliš nízka, aby nedošlo k nízkej rastovej reakcii androgénnych tkanív aj bez súčasného podávania antiandrogénov.
8. Rastová reakcia jednotlivých tkanív, ktoré sú podmienené androgénnym účinkom, nemá výhradne androgénny pôvod, t. j. zmenu hmotnosti niektorých tkanív môžu vyvolať aj chemikálie, ktoré nie sú androgénni agonisti. Rastová reakcia, ktorá sa prejavuje súčasne vo viacerých tkanivách, je však dôkazom mechanizmu s vyššou príznačnosťou pre androgény. Vysoké dávky silných estrogénov môžu napríklad viesť k zvýšeniu hmotnosti semenných mechúrikov, ale ostatné tkanivá podmienené účinkom androgénov v teste podobnú reakciu nevykazujú. Antiandrogénne chemikálie môžu pôsobiť buď ako antagonisti androgénnych receptorov, alebo ako inhibítory 5 α -reduktázy. Účinok inhibítorov 5 α -reduktázy je variabilný, pretože premena na silnejší dihydrotestosterón sa líši v závislosti od tkaniva. V porovnaní so silným antagonistom androgénnych receptorov (AR), ako napr. flutamid, sa účinky antiandrogénov, ktoré inhibujú 5 α -reduktázu, ako napr. finasterid, prejavujú výraznejšie na ventrálnej prostate ako na ostatných tkanivách. Pomocou tohto rozdielu v reakcii tkaniva možno rozlišovať medzi mechanizmom pôsobenia vyvolaným androgénnym receptorom a 5 α -reduktázou. Okrem toho má androgénny receptor evolučnú súvislosť s receptorom iných steroidných hormónov a niektoré ďalšie hormóny môžu pri podávaní vo vysokých suprafyziologických dávkach vytvárať väzby a pôsobiť proti rastovým účinkom TP (13). Ďalej je takisto pravdepodobné, že zvýšený metabolizmus steroidov a následné zníženie sérového testosterónu by mohlo obmedziť rast tkaniva podmieneného účinkom androgénov. Preto by sa akýkoľvek pozitívny výsledok Hershbergerovho biologického testu mal obyčajne hodnotiť na základe váhy dôkazov vrátane testov in vitro, ako sú napríklad testy väzieb na androgénne receptory a estrogénne receptory (ER) a zodpovedajúce testy transkripčnej aktivity, alebo iných testov in vivo, ktoré skúmajú podobné androgénne cieľové tkanivá, ako je napríklad test na pubertálnych samcoch, 15-dňový test na intaktných dospelých samcoch, 28-dňové alebo 90-dňové štúdie s opakovanými dávkami.

9. Skúsenosti ukazujú, že xenobiotické androgény sú zriedkavejšie ako xenobiotické antiandrogény. Očakáva sa preto, že Hershbergerov biologický test sa bude najčastejšie používať na skrining antiandrogénov. Postup testu na androgény by sa však mohol odporučiť pre steroidné alebo steroidom podobné chemikálie alebo chemikálie, v prípade ktorých bola indikácia možných androgénnych účinkov odvodená pomocou metód zahrnutých do úrovne 1 alebo 2 koncepčného rámca (dodatok 2). Nežiaduce účinky spojené s (anti)androgénymi profilmi možno pozorovať aj v testoch úrovne 5, čo vedie k potrebe posúdiť, či chemikálie pôsobia na endokrinný systém.
10. Uznáva sa, že všetky postupy využívajúce zvieratá by mali byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (26). Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (17).
11. Rovnako ako v prípade každého biologického testu používajúceho pokusné zvieratá je potrebné dôkladne zvážiť, či je vykonanie tejto štúdie nevyhnutné. V zásade k tomuto rozhodnutiu môžu viesť dva dôvody:
 - potenciál vysokej expozície (úroveň 1 koncepčného rámca) alebo známky (anti)androgénnych účinkov v testoch *in vitro* (úroveň 2) s cieľom vyšetriť, či takéto účinky môžu nastať *in vivo*;
 - účinky zodpovedajúce (anti)androgénnym účinkom v *in vivo* testoch na úrovni 4 alebo 5 s cieľom vyšetriť konkrétny mechanizmus pôsobenia, napríklad zistiť, či účinky spôsobil (anti)androgénny mechanizmus.
12. Vymedzenia pojmov použité v tejto testovacej metóde sú uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

13. Citlivosť Hershbergerovho biologického testu je založená na použití samcov s minimálnou produkciou endogénnych androgénov. Preto sa používajú kastrované samce za predpokladu, že po kastrácii uplynie dostatočný čas na regresiu cieľových tkanív na minimálnu a jednotnú východiskovú hmotnosť. Pri skriningu možnej androgénnej aktivity sú teda v obehu nízke endogénne hladiny androgénov, os hypotalamus-hypofýza-gonády nie je schopná kompenzácie prostredníctvom mechanizmov spätnej väzby, schopnosť reakcie tkanív sa maximalizuje a počiatočná variabilita hmotnosti tkaniva sa minimalizuje. Pri testovaní možnej antiandrogénnej aktivity možno dosiahnuť stabilnejší nárast hmotnosti tkaniva stimuláciou tkanív referenčným androgénom. V dôsledku toho sa pri Hershbergerovom biologickom teste vyžaduje len 6 zvierat na dávkovú skupinu, zatiaľ čo pri iných testoch, ktoré používajú intaktné pubertálne alebo dospelé samce, sa odporúča 15 samcov na dávkovú skupinu.
14. Kastrácia peripubertálnych samcov potkana sa vykoná primeraným spôsobom použitím schválených anestetík a sterilných postupov. V prvých dňoch po operácii by sa mali podávať analgetiká s cieľom zmierniť pooperačné bolesti. Kastrácia zvyšuje presnosť testu pri detekcii slabých androgénov a antiandrogénov, pretože eliminuje kompenzačné endokrinné mechanizmy spätnej väzby, ktoré sa prejavujú u intaktného zvieraťa a ktoré môžu zmierniť účinky podávaných androgénov a antiandrogénov, a vylúči vysokú variabilitu hladiny testosterónu v sére medzi jednotlivými zvieratami. Preto je v dôsledku kastrácie potrebný na testovanie týchto endokrinných aktivít nižší počet zvierat.
15. Pri testovaní možnej androgénnej aktivity sa testovaná chemikália podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou počas desiatich po sebe nasledujúcich dní. Testované chemikálie sa podávajú minimálne dvom ošetrovaným skupinám pokusných zvierat, pričom v každej skupine sa použije jedna úroveň dávky. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. Štatisticky významný nárast hmotnosti dvoch alebo viacerých cieľových orgánov v skupinách, ktorým sa podala testovaná chemikália, v porovnaní s kontrolnou skupinou nosiča indikuje pozitívny test testovanej chemikálie na možný androgénny účinok (pozri odsek 60). Androgény, ako napr. trenbolón, na ktorý nepôsobí 5 α -reduktáza, majú v porovnaní s TP výraznejší účinok na LABC a GP, všetky tkanivá by však mali vykazovať zvýšený rast.
16. Pri testovaní možnej antiandrogénnej aktivity sa testovaná chemikália podáva denne orálnou sondou alebo podkožnou injekciou počas desiatich po sebe nasledujúcich dní v rovnakých denných dávkach ako TP (0,2 alebo 0,4 mg/kg/d) podkožnou injekciou. Vo validačnom programe sa stanovuje, že sa môže použiť dávka TP v množstve 0,2 alebo 0,4 mg/kg/d, pretože obidva varianty boli pri určovaní antiandrogénov účinné, a preto by sa v teste

mala vybrať iba jedna dávka. Postupné dávky testovaných chemikálií sa podávajú minimálne trom ošetrovaným skupinám pokusných zvierat, pričom v každej skupine sa použije jedna úroveň dávky. Zvieratá sa pitvú približne 24 hodín po poslednej dávke. Štatisticky významné zníženie hmotnosti dvoch alebo viacerých cieľových orgánov v skupinách, ktorým sa podala testovaná chemikália a TP, v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorej sa podal iba TP, indikuje pozitívny test testovanej chemikálie na možný antiandrogénny účinok (pozri odsek 61).

OPIS METÓDY

Výber druhu a kmeňa

17. Potkany sa v Hershbergerovom biologickom teste bežne používajú od 30. rokov 20. storočia. Hoci je z biologického hľadiska pravdepodobné, že reakcie u myši by boli podobné ako u potkanov, na základe 70-ročných skúseností s modelom používajúcim potkany sa pre Hershbergerov biologický test vybral tento druh. Údaje získané z Hershbergerovho biologického testu môžu navyše priniesť výsledky, ktoré môžu viesť k dlhodobej viacgeneračnej štúdií, preto sa v oboch štúdiách môžu použiť zvieratá z rovnakého druhu, kmeňa a zdroja.
18. Protokol umožňuje laboratóriám vybrať kmeň potkanov, ktorý bude použitý v teste, a vo všeobecnosti by to mal byť kmeň, ktorý zúčastnené laboratórium používalo v minulosti. Môžu sa použiť bežne používané laboratórne kmene potkanov; nemali by sa ale používať kmene, u ktorých dochádza k dospievaniu podstatne neskôr ako 42 dní po narodení, pretože kastrácia takýchto samcov vo veku 42 dní by mohla znemožniť meranie hmotnosti žalúda, ktoré možno vykonať až po oddelení predkožky od tela penisu. Preto sa až na výnimočné prípady nepožievajú kmene potkanov vyšľachtené z kmeňa Fischer 344. Pohlavný vývoj u potkanov z kmeňa Fischer 344 prebieha v inom časovom rozmedzí v porovnaní s inými bežnejšie používanými kmeňmi, ako je Sprague Dawley alebo Wistar (16). V prípade použitia takého kmeňa musí laboratórium vykonať kastráciu u zvierat, ktoré sú o niečo staršie, a preukázať citlivosť použitého kmeňa. Laboratórium musí jasne uviesť odôvodnenie výberu kmeňa potkanov. Ak je skríningový test predbežným testom štúdie orálnej toxicity pri opakovaných dávkach, reprodukčnej a vývojovej štúdie alebo dlhodobej štúdie, vo všetkých štúdiách sa podľa možnosti použijú zvieratá z toho istého kmeňa a zdroja.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

19. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Tieto opisy starostlivosti a zaobchádzania predstavujú minimálne normy a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať prednosť miestne predpisy, ako napríklad smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (26). Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (v rozsahu približne ± 3 °C). Relatívna vlhkosť by mala byť minimálne 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť maximálnu úroveň 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti. Cieľom by mala byť relatívna vlhkosť vzduchu 50 - 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé. Pokiaľ ide o denný svetelný rytmus, malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.
20. S ohľadom na nízky vek zvierat a na skutočnosť, že potkany sú sociálne zvieratá, sa uprednostňuje umiestnenie zvierat v skupinách pred izoláciou zvierat. Umiestnením zvierat po dvoch alebo troch na kletku sa zabráni stiesneniu zvierat a vzniku súvisiaceho stresu, ktorý by mohol narušiť hormonálnu kontrolu vývoja akcesórnych tkanív pohlavných orgánov. Kletky sa musia dôkladne vyčistiť, aby sa odstránili možné kontaminanty, a usporiadať tak, aby sa minimalizovali možné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Výberom vhodnej veľkosti kletiek (~ 2 000 centimetrov štvorcových) sa zabráni ich preplneniu.
21. Každé zviera sa humánnym spôsobom jednotlivo označí (napr. pomocou ušných značiek alebo štítkov). Metóda značenia sa zaznamená.
22. Laboratórne krmivo a pitná voda by mali byť k dispozícii neobmedzene. Laboratóriá by mali v priebehu Hershbergerovho biologického testu používať laboratórne krmivá, ktoré bežne používajú pri chemickom testovaní. Vo validačných štúdiách biologického testu neboli pozorované žiadne účinky ani variabilita na základe použitého krmiva. Použité krmivo sa zaznamená a vzorka laboratórneho krmiva sa uchová pre prípad neskoršej analýzy.

Kritériá pre hmotnosti orgánov podmienených účinkom androgénov

23. Vo validačnej štúdií sa nepreukázalo, že zníženie telesnej hmotnosti má v cieľových tkanivách vplyv na zvýšenie alebo pokles rastu hmotnosti tkaniva (t. j. v tkanivách, ktorých hmotnosť sa má v tejto štúdií vážiť).

24. Na základe porovnania rôznych kmeňov potkanov, ktoré boli úspešne použité vo validačnom programe, sú hmotnosti orgánov podmienených účinkom androgénov vyššie u ťažších kmeňov potkana ako u ľahších kmeňov. Preto sa v kritériách pre Hershbergerov biologický test neuvádzajú absolútne očakávané hmotnosti orgánov pre pozitívne a negatívne kontroly.
25. Vzhľadom na to, že variačný koeficient (CV) pre tkanivo má inverzný vzťah k štatistickej významnosti, kritériá pre Hershbergerov biologický test sú založené na maximálnych hodnotách CV pre každé tkanivo (tabuľka 1). Hodnoty variačného koeficientu sú odvodené z validačných štúdií OECD. V prípade negatívnych výsledkov by laboratória mali preskúmať hodnoty variačného koeficientu (CV) z kontrolnej skupiny a ošetrenej skupiny s vysokými dávkami s cieľom určiť, či boli prekročené kritériá maximálnych hodnôt CV.
26. Štúdiá sa musí opakovať, ak: 1) tri alebo viac z desiatich možných jednotlivých hodnôt variačného koeficientu v kontrolnej skupine a ošetrovaných skupinách s vysokými dávkami prekročilo maximálne hodnoty stanovené pre štúdie agonistov a antagonistov v tabuľke 1, a 2) aspoň dve cieľové tkanivá vykazovali zanedbateľné hodnoty, t. j., hodnoty r od 0,05 do 0,10.

Tabuľka 1

Maximálne prípustné hodnoty variačného koeficientu (CV) stanovené pre cieľové akcesórne tkanivá pohlavných orgánov pre model kastrovaných samcov vo validačných štúdiách OECD ⁽¹⁾

Tkanivo	Antiandrogénne účinky	Androgénne účinky
Semenné mechúriky	40 %	40 %
Ventrálna prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperove žľazy	35 %	55 %
Žalud	17 %	22 %

POSTUP

Súlad s predpismi a overovanie laboratória

27. Na rozdiel od uterotrofickeho testu (kapitola B.54 tejto prílohy) nie je v Hershbergerovom teste potrebné pred začiatkom štúdie preukázať spôsobilosť laboratória, pretože v rámci testu prebiehajú ako jeho neoddeliteľná súčasť súbežné pozitívne (testosterón-propionát a flutamid) a negatívne kontroly.

Počet a stav zvierat

28. Každá ošetrovaná a kontrolná skupina by mala zahŕňať minimálne 6 zvierat. Týka sa to protokolu v prípade androgénov, ako aj protokolu v prípade antiandrogénov.

Kastrácia

29. Zvieratám sa po prijatí umožní počiatočná niekoľkodňová aklimatizácia s cieľom uistiť sa, že zvieratá sú zdravé a v dobrom stave. Zvieratá sa kastrujú, keď dosiahnu vek 42 dní, t. j. na 42. postnatálny deň (PND) alebo neskôr, nie však skôr, pretože u zvierat kastrovaných pred 42. PND nemusí dôjsť k oddeleniu predkožky. Pred kastráciou sa zvieratám podá anestézia, potom sa nareže miešok, odstránia sa semenníky spolu s nadsemenníkmi a podviažu sa cievy a semenovod. Po uistení sa, že nedochádza ku krvácaniu, sa miešok zašije alebo uzavrie pomocou šicích svoriek. V prvých dňoch po operácii sa zvieratám podávajú analgetiká s cieľom zmierniť pooperačné bolesti. Ak sa zakúpia kastrované zvieratá od dodávateľa, dodávateľ musí potvrdiť vek a stupeň pohlavnej zrelosti zvierat.

⁽¹⁾ Prahová hodnota CV pre dané tkanivo bola stanovená na základe grafického zápisu hodnôt CV – s postupným usporiadaním od najnižšej po najvyššiu – pre všetky prostriedky zo všetkých pokusov vo validačnom teste s použitím konkrétneho modelu (pre agonistov alebo antagonistov). Prahová hodnota CV sa pozorovala od bodu, v ktorom sú prírastky medzi hodnotami až po najbližšie najvyššie hodnoty CV v sérii výrazne väčšie ako niekoľko predchádzajúcich hodnôt CV – „hraničný bod“ (breakpoint). Je potrebné poznamenať, že hoci sa touto analýzou stanovili relatívne spoľahlivé „hraničné body“ pre model testu na antagonistov, v prípade kriviek CV v teste agonistov bol rast rovnomernejší, a preto bolo stanovenie prahovej hodnoty CV touto metódou do istej miery doplnkové.

Aklimatizácia po kastrácii

30. Aklimatizácia zvierat na laboratórne podmienky by mala pokračovať minimálne 7 dní po kastrácii, aby sa umožnila regresia hmotnosti cieľového tkaniva. Zvieratá je potrebné každý deň pozorovať a odstrániť každé zviera s príznakmi choroby alebo fyzickými abnormalitami. S podávaním dávok (v rámci štúdie) sa teda môže začať už na 49. PND, nie však neskôr ako na 60. PND. Vek pri pitve nesmie byť vyšší ako 70. PND. Táto flexibilita umožňuje laboratóriu efektívne si naplánovať činnosti pri vykonávaní testu.

Telesná hmotnosť a randomizácia skupín

31. Rozdiely v telesnej hmotnosti u jednotlivých zvierat sú zdrojom variability v hmotnostiach tkaniva v rámci jednotlivých skupín zvierat a medzi nimi. Vyššia variabilita hmotnosti tkaniva má za následok zvýšený variačný koeficient (CV) a znižuje štatistickú významnosť testu (niekedy sa označuje ako citlivosť testu). Preto je potrebné experimentálne a štatistické riadenie odchýlok telesnej hmotnosti.
32. Experimentálne riadenie zahŕňa zavedenie malých odchýlok telesnej hmotnosti v rámci pokusných skupín a medzi nimi. Po prvé, nezvyčajne malé alebo veľké zvieratá sa vyradia a nebudú zahrnuté do pokusných skupín. Na začiatku štúdie by hmotnostné odchýlky použitých zvierat nemali presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti (napríklad $175 \text{ g} \pm 35 \text{ g}$ u kastrových peripubertálnych potkanov). Po druhé, zvieratá sa rozdelia do skupín (kontrolných a ošetrovaných) na základe náhodného rozloženia hmotnosti tak, že stredná telesná hmotnosť každej skupiny sa od akejkoľvek inej skupiny štatisticky nebude odlišovať. Použitý postup blokovej randomizácie sa zaznamená.
33. Keďže v dôsledku toxicity sa môže telesná hmotnosť ošetrovaných skupín v porovnaní s kontrolnou skupinou znížiť, namiesto telesnej hmotnosti by sa pri pitve ako štatistická spolupremenná mohla použiť telesná hmotnosť zaznamenaná prvý deň podávania testovanej chemikálie.

Dávkovanie

34. Na určenie možného androgénneho pôsobenia testovanej chemikálie in vivo zvyčajne postačujú dve dávkové skupiny testovanej chemikálie, pozitívna kontrola a (negatívna) kontrola nosiča (pozri odsek 43), preto sa tento model uprednostňuje v záujme dobrých životných podmienok zvierat. Ak je cieľom odvodiť krivku závislosti reakcie od dávky alebo extrapolovať nižšie dávky, sú potrebné aspoň 3 dávkové skupiny. Ak sa vyžadujú informácie nad rámec určenia androgénneho pôsobenia (napríklad odhad účinnosti), je potrebné zvážiť iný dávkový režim. Na účely testovania antiandrogénov sa testovaná chemikália podáva spolu s referenčným androgénnym agonistom. Použijú sa najmenej 3 pokusné skupiny s rôznymi dávkami testovanej chemikálie, pozitívna a negatívna kontrola (pozri odsek 44). So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme, aký sa použil u pokusných skupín.
35. Pri navrhovaní a výbere úrovni dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike testovanej chemikálie a príbuzných materiálov. Pri určovaní najvyššej dávky sa musí v prvom rade vziať do úvahy úroveň LD_{50} a/alebo informácie o akútnej toxicite, aby sa predišlo úhynu, ťažkému utrpeniu alebo bolesti zvierat (17) (18) (19) (20), a v druhom rade dostupné informácie o dávkach použitých v štúdiách subchronickej a chronickej toxicity. Najvyššia dávka by vo všeobecnosti nemala spôsobiť zníženie konečnej telesnej hmotnosti zvierat väčšie ako 10 % kontrolnej hmotnosti. Najvyššia dávka by mala byť buď 1) najvyššia dávka, ktorá zabezpečí prežitie zvierat a nespôsobuje výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po 10 po sebe nasledujúcich dňoch podávania chemikálie do maximálnej dávky $1\,000 \text{ mg/kg/deň}$ (pozri odsek 36), alebo 2) dávka, ktorá vyvolá (anti)androgénne účinky, podľa toho, ktorá dávka je nižšia. Dlhé intervaly, napr. pol log jednotiek (zodpovedajúce priebehu dávky 3,2) alebo až 1 log jednotiek medzi dávkami sú prípustné. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávkovania (pozri odsek 37) s cieľom stanoviť dávky, ktoré sa použijú.

Limitná úroveň dávky

36. Ak test vykonaný v súlade s opísanými postupmi, pri ktorom sa použije limitná dávka $1\,000 \text{ mg/kg}$ telesnej hmotnosti/deň alebo nižšia dávka, nevyvolá štatisticky významnú zmenu hmotnosti reprodukčných orgánov, potom testovanie s ďalšími úrovňami dávok možno považovať za zbytočné. Limitná dávka sa použije s výnimkou prípadov, keď údaje o expozícii u človeka indikujú potrebu použiť vyššiu úroveň dávky.

Úvahy k zisťovaniu rozsahu

37. V prípade potreby sa na niekoľkých zvieratách môže vykonať predbežná štúdia na zistenie rozsahu s cieľom vybrať vhodné dávkové skupiny [na základe metód testovania akútnej toxicity (kapitoly B.1 a, B.1 b tejto prílohy (27), OECD TG 425 (19))]. V prípade Hershbergerovho biologického testu je cieľom vybrať dávky, ktoré zabezpečia prežitie zvierat a ktoré nespôsobujú výraznú toxicitu alebo utrpenie zvierat po desiatich po sebe nasledujúcich dňoch podávania chemikálie, až do limitnej dávky 1 000 mg/kg/deň, ako sa uvádza v odseku 35 a 36. V tomto ohľade možno vychádzať z usmerňovacieho dokumentu OECD (17), v ktorom sa vymedzujú klinické príznaky indikujúce toxicitu alebo utrpenie zvierat. Ak je to v rámci tejto štúdie na zistenie rozsahu po desiatich dňoch podávania možné, cieľové tkanivá sa môžu odobrať a odvážiť približne 24 hodín po podaní poslednej dávky. Tieto údaje možno následne použiť ako východisko pri výbere dávok v hlavnej štúdii.

Referenčné chemikálie a nosič

38. Referenčným androgénnym agonistom je testosterón propionát (TP), č. CAS 57-82-5. Úroveň dávky referenčného TP môže byť 0,2 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo 0,4 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. Referenčným androgénnym antagonistom je flutamid (FT), č. CAS 1311-84-7. Úroveň dávky referenčného FT je 3 mg/kg telesnej hmotnosti/deň a mala by sa podávať spolu s dávkou referenčného TP.
39. Podľa možnosti sa odporúča zvážiť použitie vodného roztoku/suspenzie. Keďže mnohé androgénne ligandy alebo ich metabolické prekursorsy sú však väčšinou hydrofóbne, najbežnejším prístupom je použitie roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný, arašidový, sezamový alebo olivový olej). Testovanú chemikáliu možno rozpustiť v minimálnom množstve etanolu s koncentráciou 95 % alebo v inom vhodnom rozpúšťadle a zriediť na konečné pracovné koncentrácie v testovacom nosiči. Toxické vlastnosti rozpúšťadla musia byť známe a musia sa testovať v samostatnej kontrolnej skupine určenej výhradne na testovanie rozpúšťadla. Ak je testovaná chemikália stabilná, môže sa pri jej rozpúšťaní použiť jemné ohrievanie a intenzívne mechanické pôsobenie. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči. Ak je testovaná chemikália stabilná počas celého trvania štúdie, môže sa pripraviť jeden počiatočný alikvotný podiel testovanej chemikálie a uvedené dávkové riedenia sa denne môžu pripravovať tak, aby nedošlo ku kontaminácii a znehodnoteniu vzoriek.

Podávanie dávok

40. TP sa podáva podkožnou injekciou a FT orálnou sondou.
41. Testovaná chemikália sa podáva orálnou sondou alebo podkožnou injekciou. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť dobré životné podmienky zvierat a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie. Okrem toho, ak injekcia vedie k pozitívnym výsledkom, pred začiatkom rozsiahleho dlhodobého testovania je pri výbere spôsobu podávania potrebné zohľadniť toxikologické aspekty, ako je význam pre expozíciu u človeka (napríklad orálna sonda ako model požitia, podkožná injekcia ako simulácia vdýchnutia alebo dermálnej absorpcie), a existujúce toxikologické informácie a údaje o metabolizme a kinetike (napríklad potreba predísť metabolizmu prvého prechodu, vyššia účinnosť určitého spôsobu expozície).
42. Chemikália sa zvieratám podáva rovnakým spôsobom a v rovnakej časovej postupnosti počas desiatich po sebe nasledujúcich dní približne v 24-hodinových intervaloch. Úroveň dávok sa denne upravuje na základe súbežných denných meraní telesnej hmotnosti. Objem dávky a čas jej podania sa každý deň expozície zaznamená. V záujme zabezpečenia zmysluplnej interpretácie údajov je potrebné dbať na to, aby sa neprekročila maximálna prípustná dávka uvedená v odseku 35. Zníženie telesnej hmotnosti, klinické príznaky a ďalšie nálezy sa musia v tejto súvislosti dôkladne posúdiť. V prípade orálnej sondy sa použije žalúdočná sonda alebo vhodná intubačná kanyla. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Je potrebné postupovať podľa miestnych usmernení k starostlivosti o zvieratá, objem by však nemal presiahnuť 5 ml/kg telesnej hmotnosti s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa môže použiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti. V prípade podkožných injekcií sa dávky vpichujú v oblasti medzi lopatkami alebo v krížovej oblasti pomocou sterilnej ihly (napríklad veľkosť 23 G alebo 25 G) a tuberkulínovej striekačky. Nevyžaduje sa oholenie miesta vpichu. Je potrebné zaznamenať všetky straty, únik na mieste vpichu alebo neúplné podanie dávky. Celkový denný vpichnutý objem na potkana by nemal presiahnuť 0,5 ml/kg telesnej hmotnosti.

Osobitné postupy pre androgénnych agonistov

43. V prípade testovania androgénnych agonistov predstavuje skupina nosiča negatívnu kontrolu a skupina, ktorej je podávaný TP, pozitívnu kontrolu. Na účely testovania biologickej aktivity zodpovedajúcej androgénym agonistom sa testovaná chemikália podáva pokusným skupinám vo vybraných dávkach počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Na účely zistenia štatisticky významného zvýšenia hmotnosti piatich akcesórnych tkanív pohlavných orgánov v pokusných skupinách, v ktorých sa zvieratám podáva testovaná chemikália, sa tieto hmotnosti porovnávajú so skupinou nosiča.

Osobitné postupy v prípade androgénnych antagonistov a inhibítory 5 α -reduktázy

44. V prípade testovania androgénnych antagonistov a inhibítorov 5 α -reduktázy predstavuje skupina, v ktorej sa zvieratám podáva TP, negatívnu kontrolu a skupina, v ktorej sa zvieratám podávajú referenčné dávky TP spolu s FT, predstavuje pozitívnu kontrolu. Na účely testovania biologickej aktivity zodpovedajúcej androgénym antagonistom a inhibítorom 5 α -reduktázy sa podáva referenčná dávka TP a testovaná chemikália počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Na účely zistenia štatisticky významného zníženia hmotnosti piatich akcesórnych tkanív pohlavných orgánov v pokusných skupinách, v ktorých sa zvieratám podáva TP spolu s testovanou chemikáliou, sa tieto hmotnosti porovnávajú so skupinou, v ktorej sa zvieratám podáva iba referenčný TP.

POZOROVANIA**Klinické pozorovania**

45. Všeobecné klinické pozorovania je potrebné vykonávať aspoň raz denne a v prípade zistenia známk toxicity častejšie. Pozorovania sa podľa možnosti vykonávajú v rovnakom čase (časoch) každý deň a so zreteľom na obdobie najvyšších očakávaných účinkov po dávkovaní. U všetkých zvierat sa sleduje úmrtnosť, chorobnosť a všeobecné klinické príznaky, ako napríklad zmeny v správaní, na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerекcia, veľkosť zreníc, nezvyčajné dýchanie).
46. Každé uhynuté zviera sa odstráni a vyradí bez ďalšej analýzy údajov. Úmrtnosť zvierat pred pitvou sa uvedie do záznamov štúdie spolu so zjavnými príčinami úmrtnosti. Všetky moribundné zvieratá sa humánne utratia. Všetky moribundné a následne utratené zvieratá sa uvedú do záznamu štúdie spolu so zjavnými príčinami chorobnosti.

Telesná hmotnosť a spotreba potravy

47. Všetky zvieratá sa musia denne vážiť s presnosťou na 0,1 g, pričom prvé váženie sa vykoná tesne pred začatím testu, t. j. pri rozdeľovaní zvierat do skupín. Nepovinne možno merať množstvo potravy spotrebovanej počas testu, a to vážením krmidiel v každej kletke. Výsledky spotreby potravy sa vyjadria v gramoch na potkana na deň.

Pitva a váženie tkanív a orgánov

48. Približne 24 hodín po poslednom podaní testovanej chemikálie sa potkany utratia a odkrvia v súlade s bežnými postupmi laboratória, ktoré test vykonáva, a vykoná sa pitva. Metóda humánneho utratenia sa zaznamená do správy laboratória.
49. Ak je to možné, zvolí sa náhodné poradie pitiev zvierat zo všetkých skupín, aby sa predišlo priamemu postupu jedným alebo druhým smerom podľa dávkových skupín, čo by mohlo ovplyvniť údaje. Všetky pitevné nálezy, t. j. patologické zmeny/viditeľné poškodenia sa zaznamenajú a uvedú do správy.
50. Päť tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, SV, LABC, COW, GP) sa odváži. Tieto tkanivá sa vypreparujú, dôkladne zbavia prebytočného príľnavého tkaniva a tuku a určí sa ich čerstvá (nefixovaná) hmotnosť. S každým tkanivom je potrebné zaobchádzať veľmi opatrne, aby sa predišlo strate tekutín a vysychaniu, ktoré by vzhľadom na nižšie zaznamenané hmotnosti mohli viesť k významným chybám a variabilite. Niektoré tkanivá môžu byť

veľmi malé alebo sa môžu ťažko pitvať, čo povedie k variabilite. Je preto dôležité, aby osoby, ktoré vykonávajú pitvu akcesórnych tkanív pohlavných orgánov poznali štandardné postupy pitvy týchto tkanív. Príručku štandardných operačných postupov (SOP) pri pitve poskytuje organizácia OECD (21). Dôkladnou prípravou v súlade s príručkou SOP sa minimalizuje potenciálny zdroj variability v štúdiu. Podľa možnosti by za pitvu daného tkaniva mal byť zodpovedný ten istý prosektor, aby sa predišlo individuálnym rozdielom pri spracovaní tkaniva. Ak to nie je možné, pitva by sa mala navrhnuť tak, aby každý prosektor pitval dané tkanivo zo všetkých ošetrovaných skupín a jeden prosektor pitval všetky tkanivá z kontrolnej skupiny, zatiaľ čo ďalšia osoba by bola zodpovedná za ošetrované skupiny. Všetky akcesórne tkanivá pohlavných orgánov sa odvážia bez vysušenia s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť pre jednotlivé zvieratá sa zaznamenávajú.

51. Niektoré tkanivá môžu byť veľmi malé alebo sa môžu ťažko pitvať, čo povedie k variabilite. Predchádzajúce práce poukázali na rozsah variačného koeficientu (CV), ktorý sa podľa všetkého líši v závislosti od odbornosti laboratória. V niektorých prípadoch boli v rámci konkrétneho laboratória pozorované veľké rozdiely absolútnych hmotností tkanív, ako je VP a COWS.
52. Váženie pečene, páru obličiek a páru nadobličiek je nepovinné. Tkanivá sa opäť zbavia akýchkoľvek príľnavých tkanív a tuku. Hmotnosť pečene sa odváži a zaznamená s presnosťou na 0,1 g a hmotnosť obličiek sa odváži a zaznamená s presnosťou na 0,1 mg. Nielenže androgény vplyvajú na pečeň, obličky a nadobličky, tieto orgány zároveň slúžia ako užitočné ukazovatele toxicity systému.
53. Meranie sérového luteinizačného hormónu (LH), folikulárneho stimulujúceho hormónu (FSH) a testosterónu (T) je nepovinné. Hladiny sérového T majú význam pri určovaní, či testovaná chemikália indukuje metabolizmus testosterónu v pečeni, čo vedie k zníženiu hladín séra. Bez údajov o T sa môže zdať, že k takémuto účinku dochádza prostredníctvom antiandrogénneho mechanizmu. Hladiny LH poskytujú informácie o schopnosti antiandrogénu nielen znížiť hmotnosť orgánu, ale aj ovplyvniť funkciu hypotalamu-hypofýzy, čo v dlhodobých štúdiách môže vyvolať nádory na semenníkoch. FSH je dôležitý hormón pre spermatogézu. Merania sérového T4 a T3 sú takisto nepovinné merania, ktoré by priniesli užitočné dodatočné informácie o schopnosti narušovať homeostázu hormónov štítnej žľazy. Ak sa majú vykonať merania hormónov, potkanom sa pred pitvou podá anestézia a odoberie sa im krv punkciou srdca, pričom pri výbere metódy anestézie sa dbá na to, aby neovplyvnila merania hormónov. Metóda prípravy séra, zdroj rádioimunologickej analýzy a ostatné meracie zariadenia, analytické postupy a výsledky sa zaznamenávajú. Hladiny LH sa do správy uvedú v ng/ml séra, rovnako ako hladina T.
54. Opis pitvy tkanív je uvedený ďalej spolu s podrobným pitevným postupom a fotografiami, ktoré boli v rámci validačného programu zverejnené ako doplnkový materiál (21). Na webovej stránke kórejskej Správy pre potraviny a liečivá (Korea Food and Drug Administration) je k dispozícii aj video (22).

— V polohe, keď je zviera otočené bruchom nahor, zistíte, či sa predkožka penisu oddelila od žalúda. Ak áno, stiahnite predkožku a odstráňte žalud, odvážte ho (s presnosťou na 0,1 mg) a hmotnosť zaznamenajte.

— Otvorte brušnú kožu a stenu tak, aby bolo vidno vnútornosti. Ak sa vážia nepovinné orgány, odstráňte a odvážte pečeň s presnosťou na 0,1 g, odstráňte žalúdok a črevá, odstráňte pár obličiek a pár nadobličiek a odvážte ich s presnosťou na 0,1 mg. Týmto vypreparovaním sa odhalí močový mechúr a začína sa prepravovanie cieľových samčích akcesórnych tkanív.

— Na pitvu VP oddelte močový mechúr od brušnej svalovej vrstvy prerezaním spojivového tkaniva pozdĺž stredovej osi. Posuňte močový mechúr dopredu smerom k semenným mechúrikom, čím sa odhalí ľavý a pravý lalok ventrálnej prostaty (pokrytý tukovou vrstvou). Opatrne odstráňte tuk z pravého a ľavého laloku VP. Jemne odoberte pravý lalok VP z močovej trubice a vyrežte lalok z močovej trubice. Zatiaľ čo držíte pravý lalok VP, jemne odoberte ľavý lalok VP z močovej trubice a následne ho vyrežte, odvážte s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.

— Na pitvu SVCG posuňte močový mechúr dozadu, čím odhalíte semenovod a pravý a ľavý lalok semenných mechúrikov a koagulačné žľazy (SVCG). Úniku tekutiny zabránite upevnením svorky pri koreni SVCG, kde sa semenovod pripája na močovú trubicu. Opatrne vyrežte SVCG, pri zavedenej svorke odstráňte tuk a adnexá, zaveďte lodičku na váženie, odstráňte svorku, odvážte s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.

- Na pitvu zdvíhača konečníka a bulbokavernózných svalov (LABC) je potrebné odhaliť svaly a koreň penisu. Svaly zdvíhača konečníka obaľujú hrubé črevo, zatiaľ čo predná časť zdvíhača konečníka a bulbokavernózných svalov je pripojená k bulbu penisu. Koža a adnexá z perianálnej oblasti siahajúce od koreňa penisu k prednému koncu konečníka sa odstránia. Bulbokavernózne svaly sa postupne oddelia od bulbu penisu a tkanív. Hrubé črevo sa rozreže na dve časti a zdvíhač konečníka spolu s bulbokavernóznymi svalmi možno vyrezať a odstrániť. Zdvíhač konečníka a bulbokavernózne svaly sa zbavia tuku a adnex, odvážia s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť sa zaznamená.
 - Po odstránení LABC vidno oblé Cowperove alebo bulbouretrálne žľazy (COW) pri koreni a mierne dorzálne od bulbu penisu. Pitvu je potrebné vykonať opatrne, aby sa predišlo vrúbkovaniu tenkej kapsule a zabránilo úniku tekutiny. Odvážte pár COW s presnosťou na 0,1 mg a hmotnosť zaznamenajte.
 - Okrem toho, ak počas pitvy a preparovania dôjde k úniku tekutiny z niektorej žľazy, je potrebné túto skutočnosť uviesť do správy.
55. Ak si hodnotenie každej chemikálie vyžaduje pitvu viacerých zvierat, ako je primerané v jeden deň, začiatok štúdie možno rozložiť na dva po sebe nasledujúce dni, v dôsledku čoho sa pitva a súvisiaca práca rozloží na dva dni. Ak sa práca rozloží týmto spôsobom, v jeden deň sa použije polovica zvierat z každej ošetrenej skupiny.
56. Mŕtve telá sa po pitve vhodným spôsobom zlikvidujú.

PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

57. Údaje sa do správy uvedú jednotlivo (t. j. telesná hmotnosť, hmotnosť akcesórnych tkanív pohlavných orgánov, nepovinné merania a ostatné reakcie a pozorovania) a pre každú skupinu zvierat (stredná a štandardná odchýlka všetkých vykonaných meraní). Údaje sa uvádzajú v tabuľkovej podobe. V údajoch sa uvedie počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré boli počas testu nájdené uhynuté alebo vykazovali známky toxicity, opis pozorovaných známkov toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti.
58. Záverečná správa musí obsahovať tieto informácie:

Testovacie zariadenie

- názov zariadenia, poloha,
- vedúci štúdie a ostatní pracovníci a ich úlohy v rámci štúdie,
- dátum začiatku a konca štúdie, t. j. prvý deň podávania testovanej chemikálie a posledný deň pitvy.

Testovaná chemikália

- zdroj, sériové číslo/číslo šarže, identita, čistota, úplná adresa dodávateľa a charakteristika testovanej chemikálie (chemikálií),
- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- podmienky skladovania a spôsob a periodicita prípravy roztokov,
- všetky získané údaje o stabilite,
- všetky analýzy dávkovacích roztokov/suspenzií.

Nosič

- charakteristika testovaného nosiča (identita, dodávateľ a sériové číslo),
- odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Pokusné zvieratá a postupy chovu zvierat

- použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,
- zdroj alebo dodávateľ zvierat vrátane úplnej adresy,
- počet a vek dodaných zvierat,

- podmienky umiestnenia (teplota, osvetlenie atď.),
- krmivo (názov, typ, dodávateľ, sériové číslo, obsah a hladiny fytoestrogénov, ak sú známe),
- podstielka (názov, typ, dodávateľ, obsah),
- podmienky v kliebkach a počet zvierat na klietku.

Podmienky testu

- vek pri kastrácii a doba aklimatizácie po kastrácii,
- jednotlivé hmotnosti zvierat na začiatku štúdie (s presnosťou na 0,1 g),
- postup randomizácie a záznam o priradení do skupín nosiča, referenčných skupín, skupín, ktorým sa podáva testovaná chemikália, a kliebok,
- stredná a štandardná odchýlka telesných hmotností v každej skupine za každý deň váženia počas štúdie,
- odôvodnenie výberu dávky,
- spôsob podávania testovanej chemikálie a odôvodnenie výberu spôsobu expozície,
- pri teste na antiandrogénne účinky, ošetrovanie TP (dávka a objem),
- ošetrovanie testovanou chemikáliou (dávka a objem),
- čas podania dávky,
- pitevné postupy vrátane metód odkrvenia a anestézie,
- v prípade, že sa analyzujú séra, uvedú sa údaje o metóde. Napríklad, ak sa použije rádioimunologická analýza (RIA), do správy sa uvedie postup RIA, zdroj testovacích súprav pre RIA, dátum spotreby testovacích súprav, postup scintilačnej spektroskopie a štandardizácie.

Výsledky

- denné pozorovania jednotlivých zvierat počas dávkovania vrátane týchto informácií:
- telesné hmotnosti (s presnosťou na 0,1 g),
- klinické príznaky (ak sa pozorujú),
- všetky merania alebo poznámky týkajúce sa spotreby potravy,
- pitevné pozorovania jednotlivých zvierat vrátane týchto informácií:
- dátum pitvy,
- ošetrovaná skupina zvierat,
- identifikácia zvierat,
- prosektor,
- denná doba pitvy a preparovania,
- vek zvierat,
- konečná telesná hmotnosť v čase pitvy s uvedením prípadného štatisticky významného zvýšenia alebo zníženia telesnej hmotnosti,
- poradie odkrvenia a preparovania zvierat v čase pitvy,
- hmotnosť piatich cieľových tkanív, ktoré sú podmienené účinkom androgénov:
- ventrálna prostata (s presnosťou na 0,1 mg),
- semenné mechúriky a koagulačné žľazy vrátane tekutiny (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),
- komplex zdvíhača konečníka a bulbokavernózných svalov (s presnosťou na 0,1 mg),
- Cowperove žľazy (čerstvá hmotnosť - spárované, s presnosťou na 0,1 mg),
- žalúdok (čerstvá hmotnosť s presnosťou na 0,1 mg),

- hmotnosť nepovinných tkanív, ak boli vážené:
- pečeň (s presnosťou na 0,1 g),
- obličky (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),
- nadobličky (spárované, s presnosťou na 0,1 mg),
- všeobecné poznámky a pripomienky,
- analýza sérových hormónov, ak sa vykonala,
 - sérový LH (nepovinné – ng/ml séra) a
 - sérový T (nepovinné – ng/ml séra),
- všeobecné poznámky a pripomienky.

Zhrnutie údajov

Údaje sa zhrnú do tabuľky, v ktorej sa uvedie veľkosť vzorky jednotlivých skupín, stredná hodnota a štandardná chyba strednej hodnoty alebo štandardná odchýlka. V tabuľkách sa uvedie telesná hmotnosť v čase pitvy, zmeny telesnej hmotnosti od začiatku dávkovania po pitvu, hmotnosť cieľových akcesórnych tkanív pohlavných orgánov a hmotnosti nepovinných orgánov.

Rozbor výsledkov

Analýza výsledkov

59. Telesná hmotnosť a hmotnosť orgánov v čase pitvy by sa mali štatisticky analyzovať s ohľadom na také charakteristiky, ako je homogenita rozptylu s príslušnými transformáciami údajov podľa potreby. Ošetrované skupiny sa porovnávajú s kontrolnou skupinou s využitím metód ako ANOVA a následne na základe párového porovnania (napr. Dunnettov jednostranný test) a kritéria pre štatistický rozdiel, napr. $p \leq 0,05$. Určia sa štatisticky významné skupiny. Je však potrebné vyhnúť sa „relatívnej hmotnosti orgánov“ vzhľadom na neplatné štatistické predpoklady tejto manipulácie s údajmi.
60. Pokiaľ ide o androgénny agonizmus, kontrolou je testovacia skupina, ktorej sa podal iba nosič. Charakteristiky mechanizmu pôsobenia testovanej chemikálie môžu viesť k rôznym relatívnym reakciám u rôznych tkanív, napríklad trenbolón, na ktorý nepôsobí 5 α -reduktáza, má silnejšie účinky na LABC a GP ako TP. Štatisticky významné zvýšenie hmotnosti ($p \leq 0,05$) u ktorýchkoľvek dvoch alebo viacerých z piatich cieľových tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, LABC, GP, CG a SVCG) je potrebné považovať za pozitívny výsledok na androgénneho agonistu a všetky cieľové tkanivá by mali vykazovať určitú mieru rastu. Kombinované hodnotenie všetkých reakcií akcesórnych tkanív pohlavných orgánov možno vykonať pomocou vhodnej multivariačnej analýzy dát. Týmto spôsobom možno analýzu zdokonaľiť, najmä v prípadoch, keď sa štatisticky významná reakcia pozoruje iba u jedného tkaniva.
61. Pokiaľ ide o androgénny antagonizmus, kontrolou je testovacia skupina, ktorej sa podal referenčný androgén (iba testosterón propionát). Charakteristiky mechanizmu pôsobenia testovanej chemikálie môžu viesť k rôznym relatívnym reakciám u jednotlivých tkanív, napríklad inhibítory 5 α -reduktázy, ako je finasterid, majú výraznejšie účinky na ventrálnu prostatu ako iné tkanivo v porovnaní so silnými antagonistami AR, ako je flutamid. Štatisticky významné zníženie hmotnosti ($p \leq 0,05$) u ktorýchkoľvek dvoch alebo viacerých z piatich cieľových tkanív podmienených účinkom androgénov (VP, LABC, GP, CG a SVCG) v porovnaní s prípadom, keď bol zvieratám podaný iba TP, je potrebné považovať za pozitívny výsledok na androgénneho antagonistu a všetky cieľové tkanivá by mali vykazovať určitú mieru úbytku hmotnosti. Kombinované hodnotenie všetkých reakcií akcesórnych tkanív pohlavných orgánov možno vykonať pomocou vhodnej multivariačnej analýzy dát. Týmto spôsobom možno analýzu zdokonaľiť, najmä v prípadoch, keď sa štatisticky významná reakcia pozoruje iba v prípade jedného tkaniva.
62. Údaje sa zhrnú do tabuľky, v ktorej sa uvedie stredná hodnota a štandardná chyba strednej hodnoty (štandardná odchýlka je tiež prípustná) a veľkosť vzorky jednotlivých skupín. Zahrnú sa aj tabuľky jednotlivých údajov. Jednotlivé hodnoty, stredná hodnota, hodnoty SE (SD) a CV pre kontrolné údaje sa preskúmajú s cieľom určiť, či spĺňajú prípustné kritériá konzistentnosti s očakávanými historickými hodnotami. Hodnoty CV, ktoré presahujú hodnoty CV uvedené v tabuľke 1 (pozri odseky 25 a 26) pre hmotnosť jednotlivých orgánov, určia, či sa v dátových záznamoch alebo údajoch vyskytli chyby, alebo či laboratórium zatiaľ nevie presne vypreparovať tkanivá podmienené účinkom androgénov a je potrebná ďalšia odborná príprava/prax. Vo všeobecnosti sú hodnoty CV

(štandardná odchýlka delená stredná hmotnosť orgánu) opakovateľné rôznymi laboratóriami a v rámci rôznych štúdií. Uvedené údaje by mali zahŕňať prinajmenšom hmotnosť ventrálnej prostaty, semenných mechúrikov, zdvíhača konečníka a bulbokavernózných svalov, Cowperových žliaz, žalúda, pečene, telesnú hmotnosť a zmenu telesnej hmotnosti od začiatku dávkovania po pitvu. Možno uviesť aj údaje po úprave kovariancie vzhľadom na telesnú hmotnosť, nemali by sa však uvádzať namiesto neupravených údajov. Okrem toho, ak sa v žiadnej skupine nepozoruje oddelenie predkožky (PPS), výskyt PPS sa zaznamená a štatisticky porovná s kontrolnou skupinou na základe Fisherovho presného testu.

63. Pri overovaní dátových záznamov v počítači s pôvodnými kartami údajov je v záujme presnosti potrebné dôkladne preskúmať hodnoty hmotnosti orgánov, ktoré nie sú z biologického hľadiska vierohodné, alebo sa líšia viac ako o tri štandardné odchýlky od stredných hodnôt danej ošetrenej skupiny, a môže byť potrebné ich vyradiť ako pravdepodobne chybné údaje.
64. Porovnanie výsledkov štúdie s hodnotami CV podľa OECD (v tabuľke 1) často predstavuje dôležitý krok v rámci interpretácie validity výsledkov štúdie. Historické údaje o kontrolných skupinách, ktorým sa podal nosič, sa uchovávajú v laboratóriu. V laboratóriu sa uchovávajú aj historické údaje o reakciách na pozitívne referenčné chemikálie, ako je TP a FT. Laboratória môžu zároveň pravidelne testovať reakciu na známých slabých androgénnych agonistov a antagonistov a uchovávať tieto údaje. Tieto údaje možno porovnať s dostupnými údajmi OECD, aby sa zabezpečila dostatočná štatistická presnosť a významnosť metód laboratória.

Dodatok 1

VYMEDZENIA POJMOV

Androgénny je pojem používaný na opísanie kladného účinku rast tkanív závislých od androgénu.

Antiandrogénny je schopnosť chemikálie potlačiť pôsobenie testosterón-propionátu na organizmus cicavca.

Chemikália znamená látku alebo zmes.

Dátum narodenia je postnatálny deň 0.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. V prípade Hershbergerovho biologického testu sa dávka vyjadruje ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti pokusného zvierťa na deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň).

Dávkovanie je všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Moribundný je pojem používaný na opísanie zvierťa v stave umierania, t. j. blízko stavu smrti.

Postnatálny deň X je X-tý deň života po dni narodenia.

Citlivosť je schopnosť testovacej metódy správne určiť chemikálie s vlastnosťami, ktoré sa testujú.

Špecifickosť je schopnosť testovacej metódy správne určiť chemikálie bez vlastností, ktoré sa testujú.

Testovaná chemikália znamená akúkoľvek látku alebo zmes, ktorá sa testuje pomocou tejto testovacej metódy.

Validácia je vedecký postup určený na charakterizovanie prevádzkových požiadaviek a obmedzení testovacej metódy a na preukázanie jej spoľahlivosti a významu pre konkrétny účel.

Poznámka: Dokument vypracoval Sekretariát programu na vypracovanie pokynov k testovaniu na základe dohody zo 6. zasadnutia pracovnej skupiny EDTA

Koncepčný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií ako endokrinných disruptorov

Úroveň 1 Triedenie a určovanie priorít podľa dostupných informácií	— fyzikálne a chemické vlastnosti napr. MW, reaktivita, volatilita, biodegradabilita, — expozícia ľudí a životného prostredia napr. objem výroby, uvoľňovanie, spôsoby použitia — riziko napr. dostupné toxikologické údaje
Úroveň 2 <i>In vitro</i> skúšky poskytujúce mechanistické údaje	— väzobná afinita receptorov ER, AR, TR — transkripčná aktivácia — aromatáza a steroidogenéza <i>in vitro</i> — rozpoznávanie/viazanie Ah receptoru — QSAR metodiky — vysoko výkonný predbežný skrining (HTPS) — funkcia štítnej žľazy — VTG (vitelogenínová) skúška na rybách hepatocytoch — iné (podľa potreby)
Úroveň 3 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o samostatných endokrinných mechanizmoch a vplyvoch	— uterotrofský skúška (estrogénová súvislosť) — Hershbergerov test (androgénová súvislosť) — nereceptorová hormonálna funkcia — iné (napr. štítne žľazy) — VTG (vitelogenínová) skúška u rýb (estrogénová súvislosť)
Úroveň 4 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o viacnásobných endokrinných mechanizmoch a vplyvoch	— skúška OECD 407 rozšírená (sledované parametre založené na endokrinných mechanizmoch) — skúšky na pubertálnych samcoch a samiciach — skúška na intaktných dospelých samcoch — skúška gonadálnej histopatológie u rýb — skúška metamorfózy u žiab
Úroveň 5 <i>In vivo</i> skúšky poskytujúce údaje o vplyvoch endokrinných a iných mechanizmov	— 1-generačná skúška (TG41 5 rozšírená)¹ — 2-generačná skúška (TG41 6 rozšírená)¹ — reprodukčný skriningový test (TG421 rozšírený)¹ — kombinovaný 28 dňový/reprodukčný skriningový test (TG 422 enhanced)¹ — skúšky počas celého a čiastočného životného cyklu u rýb, vtákov, obojživelníkov a bezstavovcov (vývoja reprodukcia) ¹ Ďalšie možné rozšírenia a posúdi VMG mamm

VMG mamm: Skupina pre riadenie validácie testovania a posudzovania cicavcov

POZNÁMKY K RÁMCU

- Poznámka 1:** Vstup na všetkých úrovniach a výstup na všetkých úrovniach je možný a závisí od povahy existujúcich informačných potrieb na účely posúdenia nebezpečnosti a rizík.
- Poznámka 2:** Na úrovni 5 by ekotoxikológia mala zahŕňať sledované parametre, ktoré indikujú mechanizmy nepriaznivých účinkov a potenciálne poškodenie populácie.
- Poznámka 3:** Ak multimodálny model zahŕňa viacero testov jedného sledovaného parametra, daný model nahradí používanie týchto testov jedného sledovaného parametra.
- Poznámka 4:** Každá chemikália sa posudzuje jednotlivo po zohľadnení všetkých dostupných informácií a so zreteľom na funkciu rámcových úrovní.
- Poznámka 5:** Rámec sa v súčasnosti nepovažuje za úplný. Na úrovniach 3, 4 a 5 zahŕňa testy, ktoré sú buď dostupné, alebo u ktorých prebieha validácia. Pokiaľ ide o testy, u ktorých prebieha validácia, sú zahrnuté predbežne. Po vypracovaní a validácii sa formálne pridávajú do rámca.
- Poznámka 6:** Úroveň 5 zahŕňa aj iné ako konečné testy. Testy zahrnuté do tejto úrovne majú prispieť k všeobecnému posúdeniu nebezpečnosti a rizík.

LITERATÚRA

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. - 11. marec 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 a 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, p. 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, Paríž.
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. Pozri oddiel 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. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2010 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).
27. Nasledujúce kapitoly tejto prílohy:
 - B.1a, Akútna orálna toxicita – metóda stabilnej dávky
 - B.1b, Akútna orálna toxicita – metóda triedy akútnej toxicity

B.56. ROZŠÍRENÁ JEDNOGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 443 (2012). Založená je na návrhu rozšírenej jednogeneračnej reprodukčnej štúdie vývojového štádia F₁ Medzinárodného inštitútu ILSI (International Life Science Institute – ILSI) – Inštitútu pre vedecký výskum zdravia a životného prostredia (Health and Environmental Sciences Institute – HESI), technického výboru pre hodnotenie bezpečnosti poľnohospodárskych chemických látok (Agricultural Chemical Safety Assessment – ACSA Technical Committee), ako bol publikovaný v práci Coopera a kolektívu v roku 2006 (1). V návrhu štúdie sa vykonali viaceré zlepšenia a vyjasnenia s cieľom zabezpečiť pružnosť a zdôrazniť význam začatia práce s existujúcimi znalosťami, s využitím pozorovaní počas života pri riadení a prispôbovaní testovania. Táto testovacia metóda poskytuje podrobný opis prevádzkového vykonania rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity. Testovacia metóda opisuje tri kohorty zvierat generácie F₁:

kohorta 1: posudzujú sa sledované reprodukčné/vývojové parametre; táto kohorta sa môže rozšíriť tak, aby zahrnula aj generáciu F₂.

kohorta 2: posudzuje sa potenciálny účinok vystavenia chemikáliám na vyvíjajúci sa nervový systém.

kohorta 3: posudzuje sa potenciálny účinok vystavenia chemikáliám na vyvíjajúci sa imunitný systém.

2. Rozhodnutia o tom, či posudzovať druhú generáciu a či vynechať kohortu vývojovej neurotoxicity a/alebo vývojovej imunotoxicity, musia byť založené na existujúcich poznatkoch o chemikálii, ktorá sa hodnotí, ako aj na potrebách rôznych regulačných orgánov. Účelom tejto testovacej metódy je poskytnúť podrobné informácie o tom, ako sa dá štúdia vykonať, a určiť, ako sa má každá kohorta hodnotiť.
3. Postup rozhodovania o vnútornom spustení vzniku 2. generácie je opísaný v usmerňovacom dokumente OECD 117 (39) pre regulačné orgány, ktoré využívajú vnútorné spúšťače.

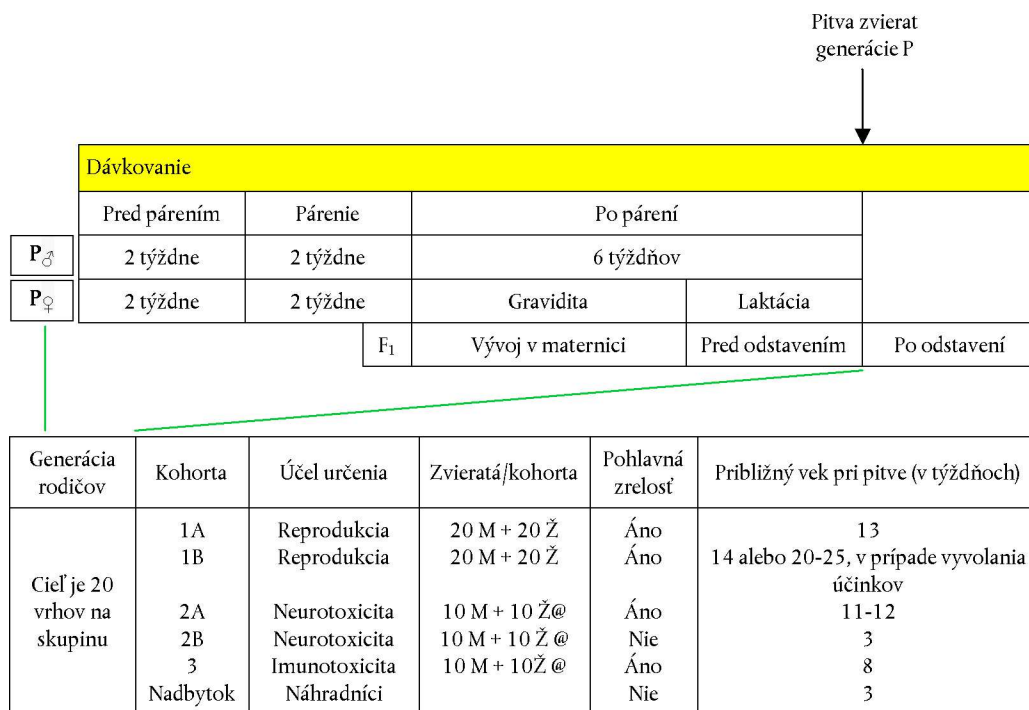
ÚVODNÉ ÚVAHY A CIELE

4. Hlavným cieľom rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity je zhodnotiť konkrétne vývojové štádiá, ktorých sa netýkali iné druhy štúdií toxicity, a testovať účinky, ktoré sa môžu vyskytnúť v dôsledku prenatálneho a postnatálneho vystavenia chemikáliám. Pre reprodukčné cieľové body sa predpokladá ako prvý krok a vždy, keď je to možné, použitie informácií zo štúdií s opakovanými dávkami (vrátane skríningových štúdií reprodukčnej toxicity, napríklad OECD TG 422 (32)) alebo z krátkodobých skríningových testov endokrinných disruptorov (napríklad uterotopický test – testovacia metóda B.54 (36) a Hershbergerov test – testovacia metóda B.55 (37)) na zisťovanie účinkov na reprodukčné orgány samcov a samíc. Môže to zahŕňať spermatogézu (testikulárnu histopatológiu) u samcov a estrálny cyklus, počty folikulov/dozrievanie oocytov a ovariálnu integritu (histopatológiu) u samíc. Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity potom slúži ako test sledovaných reprodukčných parametrov, ktoré si vyžadujú interakciu samcov so samicami, samíc so zárodkom, samíc s potomstvom a generáciu F₁ až do dosiahnutia pohlavnej zrelosti (pozri usmerňovací dokument OECD 151 podporujúci túto testovaciu metódu (40)).
5. Táto testovacia metóda je navrhnutá tak, aby poskytla hodnotenie prenatálnych a postnatálnych účinkov chemikálií na vývoj, ako aj dôkladné hodnotenie systémovej toxicity u gravidných samíc a samíc v laktácii a u mladého a dospelého potomstva. Predpokladá sa, že podrobným vyšetrovaním kľúčových sledovaných vývojových parametrov, ako je životaschopnosť potomstva, neonatálne zdravie, stav vývoja pri narodení a fyzický a funkčný vývoj do dospelosti, sa určia konkrétne cieľové orgány v potomstve. Štúdia okrem toho poskytne a/alebo potvrdí informácie o účinkoch testovaných chemikálií na integritu a činnosť reprodukčných systémov dospelých samcov a samíc. Posudzujú sa konkrétne, ale nie výlučne, tieto parametre: funkcia pohlavných žliaz, estrálny cyklus, dozrievanie spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, rozmnožovacie správanie, počatie, gravidita, pôrod a laktácia. Informácie získané z posudzovania vývojovej neurotoxicity a vývojovej imunotoxicity budú navyše charakterizovať potenciálne účinky v týchto systémoch. Údaje získané z týchto testov umožnia stanovenie hladín bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), hladín s najnižším pozorovateľným nepriaznivým účinkom (LOAEL) a/alebo referenčných dávok pre rôzne sledované parametre a/alebo sa použijú na charakterizovanie účinkov zistených v predchádzajúcich štúdiách s opakovanými dávkami a/alebo poslúžia ako návod pre následné testovanie.
6. Na obrázku 1 je znázornený schematický náčrt protokolu. Testovaná chemikália sa podáva sústavne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám sexuálne zrelej samcov a samíc. Tejto generácii rodičov (P) sa látka podáva počas stanoveného obdobia pred párením (zvoleného na základe dostupných informácií o testovanej chemikálii, ale v dĺžke najmenej dva týždne) a počas dvojtýždňového obdobia párenia. Samcom generácie P sa látka ďalej podáva najmenej do odstavenia generácie F₁. Podávanie látky trvá najmenej 10 týždňov. Môže trvať aj dlhšie, ak je potrebné objasniť účinky na reprodukciu. Samiciam generácie P sa látka ďalej podáva počas gravidity a laktácie až do ukončenia po odstavení vrhu (t. j. 8 – 10 týždňov podávania). Potomstvu generácie F₁ a testovaná chemikália ďalej podáva od odstavenia po dospelosť. Ak sa posudzuje aj druhá generácia (pozri usmerňovací dokument OECD 117 (39)), podávanie látky potomstvu generácie F₁ bude pokračovať až do odstavenia generácie F₂, alebo do ukončenia štúdie.
7. Klinické pozorovania a patologické vyšetrenia sa vykonávajú na všetkých zvieratách na príznaky toxicity s osobitným dôrazom na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov a na zdravie, rast, vývoj a činnosť potomstva. Pri odstavení sa potomstvo rozdelí na jednotlivé skupiny (kohorta 1 – 3, pozri odseky 33 a 34 a obrázok 1) pre ďalšie vyšetrovanie vrátane sexuálneho dozrievania, integrity a činnosti reprodukčných orgánov, sledovaných neurologických parametrov a parametrov správania a imunitných funkcií.
8. Pri vykonávaní štúdie je potrebné sa riadiť zásadami a hľadiskami uvedenými v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation (34).

9. Ak bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na to, aby sa zistil vplyv plánu tejto novej štúdie, testovacia metóda sa podrobí preskúmaniu a v prípade potreby bude revidovaná na základe získaných skúseností.

Obrázok 1

Schéma rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity



@ eden na vrh a zastupujúci celkových 20 vrhov, ak je to možné

OPIS METÓDY/PRÍPRAVY NA TEST

Zvieratá

Výber druhu a kmeňa zvierat

10. Voľbu druhov pre testy reprodukčnej toxicity je potrebné dôkladne zvážiť s ohľadom na všetky dostupné informácie. Vzhľadom na rozsah základných údajov a porovnateľnosť testov všeobecnej toxicity je však bežne preferovaným druhom potkan a kritériá a odporúčania uvedené v tejto testovacej metóde sa vzťahujú na tento druh. Ak sa použije iný druh, je potrebné uviesť odôvodnenie a vykonať príslušné úpravy protokolu. Kmene s nízkou plodnosťou, alebo o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt spontánnych vývojových porúch, sa nemajú používať.

Vek, telesná hmotnosť a kritériá použitia

11. Používať sa musia zdravé rodičovské zvieratá, ktoré neboli podrobené predchádzajúcim pokusom. Študovať je potrebné samcov aj samice, pričom samice by musia byť virgínne a negravidné. Zvieratá generácie P musia byť sexuálne zrelé, podobnej hmotnosti (v rámci pohlavia) na začiatku podávania látky, podobného veku (približne 90 dní) pri párení a mali by byť reprezentatívnymi predstaviteľmi skúmaného druhu a kmeňa. Zvieratá sa majú po príchode aklimatizovať aspoň 5 dní. Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a testovaných skupín tak, aby výsledkom boli porovnateľné stredné hodnoty hmotnosti jednotlivých skupín (t. j. $\pm 20\%$ strednej hodnoty).

Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie

12. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Relatívna vlhkosť má byť 30 – 70 %, pričom ideálny rozsah je 50 – 60 %. Umelé osvetlenie má byť zapnuté 12 hodín a 12 hodín má byť tma. Používať sa

môže bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Veľkú pozornosť je potrebné venovať obsahu fytoestrogénov v krmive, keďže vysoká úroveň fytoestrogénov v krmive môže ovplyvniť niektoré sledované reprodukčné parametre. Odporúčajú sa normované krmivá s otvorenou receptúrou, v ktorých je obsah estrogénových chemikálií znížený (2) (30). Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zaistenia vhodného prídavku testovanej chemikálie pri použití tejto metódy. Obsah, homogennosť a stabilitu testovanej chemikálie v krmive je potrebné overovať. Potravu a pitnú vodu je potrebné pravidelne analyzovať na obsah kontaminantov. Vzorky každej dávky krmiva používaného počas štúdie sa uchovávajú vo vhodných podmienkach (t. j. zmrazené na -20°C) až do vypracovania správy pre prípad, že by si výsledky vyžadovali ďalšiu analýzu zložiek krmiva.

13. Zvieratá sú umiestnené v klietkach v malých skupinách rovnakého pohlavia a rovnakej testovanej skupiny. Môžu byť umiestnené individuálne, aby sa predišlo možným poraneniam (napríklad samce po období párenia). Párenie prebieha vo vhodných klietkach. Po preukázanej kopulácii je potrebné samice, u ktorých sa predpokladá, že sú gravidné, umiestniť oddelene v pôrodných alebo materských klietkach, kde im bude poskytnutý vhodný a stanovený materiál na hniezdenie. Vrhnuté mláďatá sú umiestnené so svojimi matkami až do odstavenia. Zvieratá generácie F_1 sú umiestnené v malých skupinách rovnakého pohlavia a rovnakej testovanej skupiny od odstavenia do ukončenia. Ak je to vedecky odôvodnené, zvieratá môžu byť umiestnené individuálne. Úroveň fytoestrogénov obsiahnutých vo zvolenom materiáli na hniezdenie musí byť minimálna.

Počet a identifikácia zvierat

14. Každá testovaná a kontrolná skupina spravidla pozostáva z dostatočného počtu páriacich sa dvojíc tak, aby výsledkom bolo najmenej 20 gravidných samíc na dávkovú skupinu. Cieľom je dosiahnuť dostatočný počet gravidít, aby sa zabezpečilo zmysluplné hodnotenie potenciálu chemikálie pôsobiť na fertilitu, graviditu a materské správanie generácie P a na rast a vývoj potomstva generácie F_1 od oplodnenia po dosiahnutie zrelosti. Ak sa nedosiahne zamýšľaný počet gravidných zvierat, neznamená to nevyhnutne neplatnosť štúdie, keďže je potrebné každý prípad hodnotiť individuálne a zohľadniť pritom možnú príčinnú súvislosť s testovanou chemikáliou.
15. Každému zvieraťu generácie P sa pred začiatkom podávania dávok prideli jeho vlastné identifikačné číslo. Ak laboratórne historické údaje naznačujú, že výrazná časť samíc nemusí vykazovať pravidelné (štvdňové alebo päťdňové) estrálne cykly, odporúča sa posúdiť estrálne cykly pred začiatkom podávania látky. Alternatívne sa môže skupina zväčšiť tak, aby bolo zabezpečené, že v každej skupine bude mať na začiatku testovania pravidelné (štvdňové alebo päťdňové) estrálne cykly najmenej 20 samíc. Každé mláďa z potomstva generácie F_1 sa jednoznačne identifikuje pri prvom vyšetrení v 0. alebo 1. postantálny deň. Pre všetky zvieratá generácie F_1 a podľa potreby aj zvieratá generácie F_2 , a záznamy s uvedením vrhu, z ktorého pochádzajú, uchovávajú počas celého trvania štúdie.

Testovaná chemikália

Dostupné informácie o testovanej chemikálii

16. Prehľad existujúcich informácií je dôležitý pre prijímanie rozhodnutí o spôsobe podávania, voľbe nosiča, výbere druhu zvieraťa, voľbe dávok a prípadných úpravách harmonogramu dávkovania. Preto je potrebné pri plánovaní rozšírenej jednogenečnej štúdie reprodukčnej toxicity brať do úvahy všetky dôležité dostupné informácie o testovanej chemikálii, t. j. fyzikálno-chemické, toxikokinetické (vrátane metabolizmu konkrétneho druhu), toxikodynamické vlastnosti, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, metabolické procesy in vitro, výsledky predchádzajúcich štúdií toxicity a relevantné informácie o štrukturálnych analógoch. Predbežné informácie o absorpcii, distribúcii, metabolizme a eliminácii, ako aj o bioakumulácii sa dajú odvodiť z chemickej štruktúry, fyzikálno-chemických vlastností, miery viazania proteínov plazmy alebo z toxikokinetických štúdií, zatiaľ čo výsledky štúdií toxicity poskytujú doplnujúce informácie, napríklad o hladine bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), o metabolizme alebo indukcii metabolizmu.

Posúdenie toxikokinetických údajov

17. Toxikokinetické údaje z predchádzajúcich štúdií venovaných určovaniu rozsahu dávky alebo iných štúdií sa síce nevyžadujú, sú však nesmierne užitočné pri navrhovaní plánu štúdie, voľbe hladiny dávky a interpretácii výsledkov. Zvlášť prínosné sú údaje, ktoré: 1) verifikujú vystavenie vyvíjajúcich sa plodov a mláďat testovanej chemikálii (alebo príslušných metabolitov), 2) poskytujú odhad vnútornej dozimetrie a 3) hodnotia potenciálnu

saturáciu kinetických procesov v závislosti od dávky. Zohľadniť treba aj ďalšie toxikokinetické údaje, ako sú profily metabolitov, priebeh závislosti koncentrácie od času atď., pokiaľ sú k dispozícii. Doplnujúce toxikokinetické údaje sa dajú získať aj v priebehu hlavnej štúdie za predpokladu, že to neprekáža pri získavaní a interpretácii hlavných sledovaných parametrov štúdie.

Ako všeobecné usmernenie platí, že pri plánovaní rozšírenej jednogeneačnej štúdie reprodukčnej toxicity sú užitočné tieto súbory toxikokinetických údajov:

- v pokročilom období gravidity (napríklad 20. deň gravidity) – materská krv a krv plodu,
- uprostred obdobia laktácie (10. postnatálny deň) – materská krv, krv mláďaťa a/alebo mlieko,
- obdobie krátko po odstavení (napríklad 28. postnatálny deň) – vzorky krvi odstaveného mláďaťa.

Pri určovaní konkrétnych analytov (napríklad parentálnej, pôvodnej chemikálie a/alebo metabolitov) a plánu odberu vzoriek je potrebné uplatniť pružnosť. Napríklad počet a načasovanie odberov vzoriek v určený deň bude závisieť od priebehu expozície a od predchádzajúcich znalostí o toxikokinetických vlastnostiach negravidných zvierat. V prípade dietetických štúdií postačuje odber vzoriek každý určený deň v jednom stabilnom čase, keďže dávkovanie pomocou sondy môže zaručiť dodatočné časy odberu vzoriek s cieľom získať lepší odhad rozsahu vnútorných dávok. V žiadny deň odberu vzoriek však nie je potrebné vytvárať plne koncentrovaný časový priebeh. V prípade potreby sa krv pre plodové a neonatálne analýzy môže odoberať vo vrchoch podľa pohlavia.

Spôsob podávania

18. Pri výbere spôsobu podávania je potrebné zohľadniť spôsoby, ktoré sú najdôležitejšie z hľadiska expozície ľudí. Hoci protokol je vypracovaný pre prípad podávania testovanej chemikálie v krmive, môže sa upraviť na podávanie inými cestami (v pitnej vode, sondou, inhaláciou, dermálne), v závislosti od vlastností chemikálie a požadovaných informácií.

Voľba nosiča

19. V prípade potreby sa testovaná chemikália rozpustí alebo rozptýli vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa podľa možnosti najskôr zväžilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napríklad kukuričný olej). Pre iné nosiče ako voda majú byť známe toxické vlastnosti nosiča. Vyhnúť sa treba používaniu nosičov s potenciálnou vnútornou toxicitou (napríklad acetón, dimetylsulfoxid – DMSO). Je potrebné určiť stabilitu testovanej chemikálie v nosiči. Ak sa na uľahčenie podávania dávky používa nosič alebo iné aditívum, je potrebné venovať pozornosť týmto vlastnostiam: vplyv nosiča na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej chemikálie, vplyv na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť jej toxické vlastnosti, a vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo nutričný stav zvierat.

Výber dávky

20. Štúdia by spravidla mala zahŕňať najmenej tri hladiny dávky a súbežnú kontrolu. Pri voľbe vhodných dávok výskumník zväží všetky dostupné informácie vrátane informácií o podávaní dávok z predchádzajúcich štúdií, toxikokinetických údajov o gravidných alebo negravidných zvieratách, rozsahu laktačného prenosu a odhadov expozície ľudí. Ak sú k dispozícii toxikokinetické údaje, ktoré ukazujú, že saturácia toxikokinetických procesov závisí od veľkosti dávky, je potrebné dať pozor, aby sa predišlo vysokým hladinám dávok, ktoré zjavne vykazujú saturáciu, samozrejme za predpokladu, že očakávané expozície ľudí ležia výrazne pod bodom saturácie. V takých prípadoch by najvyššia hladina dávky mala byť na úrovni zlomového bodu prechodu k nelineárnemu toxikokinetickému správaniu, alebo iba tesne nad týmto bodom.
21. Ak chýbajú príslušné toxikokinetické údaje, hladiny dávok je založená na toxických účinkoch, pokiaľ nie je obmedzená fyzikálnou/chemickou podstatou testovanej chemikálie. Ak sú hladiny dávok založené na toxicite, najvyššia dávka sa vyberie tak, aby indukovala systémovú toxicitu, ale nespôsobovala uhynutie alebo vážne utrpenie zvierat.
22. Vyberá sa klesajúca postupnosť hladiny dávok s cieľom preukázať akúkoľvek závislosť účinku od dávky a stanoviť hodnotu hladín bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL), alebo dávky v blízkosti hranice zistenia, čo by umožnilo odvodenie referenčnej dávky pre najcitlivejšie sledované parametre. Aby sa predišlo veľkému rozstupu medzi hladinami NOAEL a hladinami s najnižším pozorovateľným nepriaznivým účinkom (LOAEL), často sú najvhodnejšie dvojúrovňové alebo štvorúrovňové intervaly. Pridanie štvrtej testovacej skupiny je často výhodnejšie než používanie veľmi veľkého intervalu (napríklad viac ako faktor 10) medzi hladinami dávok.

23. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať tak isto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou podania testovanej látky. Táto skupina je netestovaná alebo zdanlivo testovaná kontrolná skupina, prípadne kontrolná skupina s podávaním nosiča, ak sa používa nosič na podávanie testovanej látky. Ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič, kontrolná skupina ho dostane v najvyššom objeme, v akom je použitý v testovaných skupinách.

Limitný test

24. Ak neexistuje dôkaz toxicity pri dávke najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň v rámci štúdie s opakovanými dávkami, alebo ak sa toxicita neočakáva na základe údajov štruktúrnej a/alebo metabolickej príbuznosti chemikálií, ktoré vykazujú podobnosť metabolických vlastností in vivo/in vitro, nemusí byť nevyhnutné vykonať štúdiu s použitím viacerých hladín dávky. V takých prípadoch sa rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity môže vykonať s použitím kontrolnej skupiny a jednej dávky najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. Ak sa však pri tejto limitnej dávke zistí dôkaz reprodukčnej alebo vývojovej toxicity, budú potrebné ďalšie štúdie pri nižších hladinách dávky, aby sa stanovila hodnota NOAEL. Tieto úvahy o limitnom teste sa uplatňujú iba v prípade, keď expozícia ľudí neindikuje potrebu skúmania pri vyššej hladine dávky.

POSTUPY

Expozícia potomstva

25. Preferovanou metódou podávania látky je expozícia prostredníctvom krmiva. Ak sa vykonávajú štúdie s použitím sondy, je potrebné poznamenať, že mláďatá budú testovanú chemikáliu bežne prijímať iba nepriamo prostredníctvom mlieka, až kým sa im po odstavení nezačne dávka podávať priamo. V štúdiách, pri ktorých sa látka podáva v krmive alebo pitnej vode, mláďatá dostanú dodatočne testovanú látku priamo, keď začnú jesť samostatne počas posledného týždňa laktácie. Ak je vylučovanie testovanej chemickej látky v mlieku slabé a neexistuje dôkaz o sústavnej expozícii potomstva, treba zvážiť úpravy plánu štúdie. V týchto prípadoch je potrebné uvažovať o priamom podávaní dávky mláďatám počas obdobia laktácie na základe dostupných toxikokinetických informácií, toxicity potomstva alebo zmien biomarkerov (3) (4). Pred začatím realizácie štúdií s priamym podávaním dávok dojčeným mláďatám je potrebné dôkladne zvážiť všetky prínosy a nevýhody (5).

Dávkovací plán a podávanie dávok

26. Niektoré informácie o estrálnom cykle, histopatológii reprodukčného traktu samcov a samíc a o testikulárnej/epididymálnej analýze spermií môžu byť dostupné z predchádzajúcich štúdií toxicity s opakovanými dávkami v primeranom trvaní. Cieľom testovania v období pred párením v rámci rozšírenej jednogeneračnej štúdie reprodukčnej toxicity je preto zistenie účinkov na funkčné zmeny, ktoré môžu ovplyvňovať správanie pri párení a oplodnenie. Testovanie v období pred párením musí byť dostatočne dlhé, aby sa dosiahli stabilné podmienky expozície samcov a samíc generácie P. Vo väčšine prípadov sa za primerané považuje dvojtyždňové testovanie v období pred párením pre obe pohlavia. U samíc to predstavuje 3 – 4 úplné estrálne cykly a to by malo byť dostatočné na zistenie akýchkoľvek nepriaznivých účinkov na tieto cykly. U samcov to zodpovedá času potrebnému na epididymálny prechod dozrievajúcich spermií a malo by to umožniť zistenie post-testikulárnych účinkov na spermie (počas záverečných štádií vzniku spermií a ich epididymálneho dozrievania) pri párení. V čase ukončenia, keď je naplánovaná testikulárna a epididymálna histopatológia a analýza parametrov spermií, samce generácie P a F₁ budú exponované najmenej po dobu jedného úplného procesu spermatogenézy ((6), (7), (8), (9) a usmerňovací dokument OECD 151 (40)).
27. Scenáre expozície pred párením sa môžu upraviť, ak v predchádzajúcich štúdiách bola jednoznačne zistená testikulárna toxicita (zhoršenie spermatogenézy) alebo účinky na integritu a funkciu spermií. Podobne v prípade samíc môžu známe účinky testovanej chemikálie na estrálny cyklus a teda na sexuálnu vnímavosť byť dôvodom na odlišné scenáre expozície pred párením. V osobitných prípadoch môže byť prijateľné, aby sa testovanie samíc generácie P začalo až po získaní sterov pozitívnych na spermie (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)).
28. Po stanovení obdobia podávania dávok pred párením sa testovaná chemikália zvieratám podáva nepretržite až do pitvy. Všetkým zvieratám sa dávky podávajú rovnakou metódou. Podávanie dávok prebieha počas dvojtyždňového obdobia párenia a v prípade samíc generácie P počas gravidity a laktácie až do dňa ukončenia po odstavení. Samce sa testujú rovnakým spôsobom až do ukončenia v čase, keď sa zvieratá generácie F₁ odstavia. Pokiaľ ide o pitvu, prioritou sú samice, ktoré sa pitvú v rovnaký/približne rovnaký deň laktácie. Pitva samcov sa môže rozložiť na viacero dní v závislosti od možností laboratória. Ak sa s priamym podávaním dávok vybraným samcom

a samiciam generácie F_1 nezačalo počas obdobia laktácie, začne sa s tým po odstavení a pokračuje až do plánovanej pitvy, v závislosti od zaradenia do kohorty.

29. Pre chemikálie, ktoré sú podávané ako súčasť krmiva alebo pitnej vody, je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej chemikálie neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná chemikália podávaná v krmive, je možné použiť buď konštantnú dietetickú koncentráciu (ppm), alebo konštantnú hladinu dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvierata, pričom zvolenú možnosť je potrebné uviesť.
30. Ak je testovaná chemikália podávaná prostredníctvom sondy, objem tekutiny podanej naraz by spravidla nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (maximum pre olej, napríklad kukuričný olej, je 0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti). S výnimkou dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v testovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravujú tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých úrovniach dávky. Látka sa podáva každý deň v približne rovnakých časoch. Dávka pre každé zviera je spravidla založená na najaktuálnejšom určení individuálnej telesnej hmotnosti a upravovaná najmenej raz za týždeň u dospelých samcov a dospelých negravidných samíc a každé dva dni u gravidných samíc a zvierat generácie F_1 , ak sa podáva pred odstavením a počas 2 týždňov po odstavení. Ak toxikokinetické údaje ukazujú nízky placentárny prenos testovanej chemikálie, môže byť potrebné upraviť podávanie prostredníctvom sondy počas posledného týždňa gravidity, aby sa predišlo podávaniu nadmerne toxikkej dávky samici. V deň pôrodu sa samiciam nepodáva látka prostredníctvom sondy, ani žiadnym iným spôsobom, pri ktorom je potrebné so zvieratom manipulovať. V tento deň sa vynechá podávanie testovanej chemikálie a preferuje sa nerušený priebeh pôrodu.

Párenie

31. Každá samica generácie P sa umiestni s jedným náhodne vybraným, nespriazneným samcom z rovnakej dávkovej skupiny (párenie 1:1), až kým sa nepozoruje dôkaz kopulácie alebo kým neuplynú 2 týždne. Ak je nedostatok samcov, napríklad v dôsledku úhynu samca pred párením, môže sa samec, ktorý sa už páril, znovu páriť (1:1) s druhou samicou tak, aby všetky samice absolvovali párenie. Za 0. deň gravidity sa určí deň, keď sa potvrdí dôkaz o párení (zistí sa výskyt vaginálnej zátky alebo spermy). Zvieratá sa oddelia čo najskôr po pozorovaní dôkazu kopulácie. Ak k páreniu nedôjde ani po 2 týždňoch, zvieratá sa oddelia bez ďalšej možnosti párenia. Vzájomne spárené páry je potrebné v údajoch zreteľne identifikovať.

Veľkosť vrhu

32. Na 4. deň po pôrode sa môže upraviť veľkosť každého vrhu elimináciou mláďat, ktoré sú navyše, náhodným výberom tak, aby sa výsledok čo najviac priblížil počtu päť samcov a päť samíc v každom vrhu. Selektívna eliminácia mláďat, napríklad na základe telesnej hmotnosti, nie je vhodná. Ak počet samčích alebo samičích mláďat bráni vytvoreniu vrhu s piatimi mláďatami z každého pohlavia, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad šesť samcov a štyri samice).

Výber mláďat pre štúdie po odstavení (pozri obrázok 1)

33. Po odstavení (približne 21. PND) sa zo všetkých dostupných vrhov vyberú mláďatá na ďalšie vyšetrenia, do 20 na každú dávkovú a kontrolnú skupinu, a uchováajú sa do dosiahnutia pohlavnej zrelosti (pokiaľ sa nevyžaduje skoršie testovanie). Mláďatá sa vyberajú náhodne, s výnimkou zjavne nevyvinutých jedincov (zvieratá s telesnou hmotnosťou o viac ako dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky nižšou, než je stredná hodnota hmotnosti mláďat v príslušnom vrhu), ktorí sa nezahrnú, keďže by zrejme neboli reprezentatívnymi príslušníkmi testovanej skupiny.

Na 21. PND sa vybrané mláďatá generácie F_1 náhodne zaradia do jednej z týchto troch kohort zvierat:

kohorta 1 (1A a 1B) = testovanie reprodukčnej/vývojovej toxicity

kohorta 2 (2A a 2B) = testovanie vývojovej neurotoxicity

kohorta 3 = testovanie vývojovej imunotoxicity

Kohorta 1A: Jeden samec a jedna samica/vrh/skupinu (20/pohlavie/skupinu): prioritný výber pre primárne posúdenie účinkov na reprodukčné systémy a všeobecnej toxicity.

Kohorta 1B: Jeden samec a jedna samica/vrh/skupinu (20/pohlavie/skupinu): prioritný výber pre následné posúdenie reprodukčnej schopnosti páriacich sa zvierat generácie F_1 (pozri usmerňovací dokument OECD 117 (39)) a pre získanie dodatočných histopatologických údajov v prípadoch podozrivých reprodukčných alebo endokrinných toxických látok, alebo pre prípad, že sú výsledky z kohorty 1A nejednoznačné.

Kohorta 2A: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jeden samec alebo jedna samica na vrh), určených na neurobehaviorálne testovanie, po ktorom nasleduje neurohistopatologické posudzovanie v dospelosti.

Kohorta 2B: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jeden samec alebo jedna samica na vrh), určených na neurohistopatologické posudzovanie po odstavení (21. alebo 22. postnatálny deň). Ak počet zvierat nie je dostatočný, uprednostniť treba ich zaradenie do kohorty 2A.

Kohorta 3: Spolu 20 mláďat na skupinu (10 samcov a 10 samíc na skupinu; jedno na vrh, ak je to možné). Potrebné môžu byť ďalšie mláďatá z kontrolnej skupiny, aby sa použili ako zvieratá na pozitívnu kontrolu v teste protilátkovej reakcie závislej od T-buniek (T-cell dependant antibody response – TDAR) v 56. ($\pm$ 3) postnatálny deň.

34. Ak počet mláďat vo vrhu nie je dostatočný na obsadenie všetkých kohort, prednosť má kohorta 1, keďže tá sa môže rozšíriť vznikom generácie F_2 . Dodatočné mláďatá sa môžu zaradiť do ktorejkoľvek kohorty v prípade osobitného záujmu, napríklad ak existuje podozrenie, že chemikália je neurotoxická, imunotoxická alebo reprodukčne toxická. Tieto mláďatá sa môžu použiť na vyšetrenia v rôznych časových úsekoch alebo na hodnotenie doplnkových sledovaných parametrov. Mláďatá, ktoré neboli zaradené do kohort, sa podrobia klinickej biochemickej analýze (odsek 55) a makroskopickej pitve (odsek 68).

Druhé párenie zvierat generácie P

35. Druhé párenie sa zvyčajne pre zvieratá generácie P neodporúča, pretože ide na úkor straty dôležitých informácií o počte implantačných miest (a teda straty poimplantačných a perinatálnych údajov) pre prvý vrh. Potrebu verifikovať alebo objasniť účinok na exponované samice by lepšie naplnilo rozšírenie štúdie tak, aby zahŕňala aj párenie generácie F_1 . Druhé párenie samcov generácie P s netestovanými samicami však stále predstavuje možnosť objasniť nejednoznačné zistenia alebo podrobnejšie charakterizovať účinky na fertilitu pozorované pri prvom párení.

POZOROVANIA POČAS ŽIVOTA

Klinické pozorovania

36. U zvierat generácie P a vybraných zvierat generácie F_1 sa všeobecné klinické pozorovanie vykonáva raz denne. V prípade podávania dávky prostredníctvom sondy sú klinické pozorovania načasované na dobu pred podávaním a po podávaní dávky (z dôvodu možných príznakov toxicity spojených s maximálnou koncentráciou plazmy). Prípadné zmeny v správaní, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky príznaky toxicity sa zaznamenávajú. Dvakrát denne, počas víkendov raz denne, sa u všetkých zvierat sleduje silná toxicita, morbidita a mortalita.
37. Okrem toho sa raz týždenne vykonáva podrobnejšie vyšetrenie všetkých zvierat generácií P a F_1 (po odstavení), najvhodnejšie pri príležitosti váženia zvieraťa, čím sa minimalizuje stres z manipulácie. Pozorovania sa starostlivo vykonávajú a zaznamenávajú s použitím systémov hodnotenia, ktoré definuje testovacie laboratórium. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, kožušine, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napríklad slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedený výpočet príznakov nie je vyčerpávajúci. Zmeny chôdze, postoja a reakcie na manipuláciu, ako aj prítomnosť škľabavých pohybov alebo svalové napätie, stereotypné (napríklad nadmerné očisťovanie tela, opakované krúženie) alebo výstredné správanie (napríklad samomrzáčenie, cúvanie) je nutné tiež zaznamenávať.

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

38. Zvieratá generácie P sa vážia v prvý deň podávania dávky a potom najmenej raz týždenne. Samice generácie P sa okrem toho počas laktácie vážia v tých istých dňoch, keď sa vážia mláďatá z ich vrhov (pozri odsek 44). Všetky zvieratá generácie F_1 sa vážia individuálne po odstavení (21. PND) a potom najmenej raz týždenne. Telesná hmotnosť sa zaznamenáva aj v deň, keď dosiahnu pohlavnú zrelosť (ukončenie oddeľovania predkožky alebo otvárania vagíny). Všetky zvieratá sa vážia pri usmrtení.
39. Počas štúdie sa zaznamenáva spotreba potravy a vody (v prípade podávania testovanej chemikálie v pitnej vode) najmenej raz týždenne v rovnaké dni ako telesná hmotnosť zvierat (s výnimkou obdobia párenia). Spotreba potravy v každej klietke so zvieratami generácie F_1 sa zaznamenáva raz týždenne od ich zaradenia do príslušnej kohorty.

Estrálne cykly

40. Predbežné informácie o účinkoch na estrálny cyklus súvisiacich s testovanou chemikáliou môžu byť dostupné už z predchádzajúcich štúdií toxicity s opakovanými dávkami a môžu sa použiť pri vypracovávaní protokolu pre rozšírenú jednogeneračnú štúdiu reprodukčnej toxicity konkrétnej testovanej chemikálie. Posudzovanie estrálneho cyklu (pomocou vaginálnej cytológie) sa spravidla začne na začiatku obdobia testovania a pokračuje až do potvrdenia párenia alebo do konca dvojtyždňového obdobia párenia. Ak sa u samíc vykonával skrining zameraný na normálny estrálny cyklus už pred testovaním, je užitočné pokračovať so stermi aj po začiatku testovania, ale ak existujú obavy z nešpecifických účinkov po začiatku testovania (ako napríklad počiatočné výrazné zníženie spotreby potravy), dá sa zvieratám umožniť, aby sa prispôbili testovaniu po dobu až dvoch týždňov pred začiatkom dvojtyždňového obdobia odoberania sterov, ktoré ďalej vedie k páreniu. Ak sa takýmto spôsobom predĺži obdobie testovania samíc (t. j. na štvortýždňové testovanie pred párením), je potrebné zvážiť získanie mladších zvierat a predĺženie aj obdobia testovania samcov pred párením. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa neporušila sliznica a následne nevyvolala pseudogravidita (10) (11).
41. Vaginálne stery sa vyšetrujú denne u všetkých samíc generácie F_1 v kohorte 1A od začiatku otvárania vagíny, až kým sa nezaznamená prvý zrohovatený ster, s cieľom určiť časový interval medzi týmito dvomi udalosťami. Estrálny cyklus všetkých samíc generácie F_1 v kohorte 1A sa tiež monitoruje počas obdobia dvoch týždňov so začiatkom okolo 75. PND. Ak je navyše potrebné párenie generácie F_1 , v kohorte 1B sa sleduje vaginálna cytológia od doby začiatku párenia po zaznamenanie dôkazu o párení.

Párenie a gravidita

42. Okrem štandardných sledovaných parametrov (napríklad telesná hmotnosť, spotreba potravy, klinické pozorovania vrátane kontroly mortality/morbidity) sa zaznamenávajú aj dátumy párenia, dátum inseminácie a dátum pôrodu a vypočítava sa predkoitálny interval (od začiatku párenia po insemináciu) a dĺžka trvania gravidity (od inseminácie po pôrod). Samice generácie P sa musia v čase očakávaného pôrodu starostlivo vyšetriť na akékoľvek príznaky dystokie. Zaznamenať treba akékoľvek abnormality v správaní pri hniezdení alebo počas laktácie.
43. Deň, keď dôjde k pôrodu, je 0. deň laktácie pre samicu a 0. postnatálny deň (0. PND) pre potomstvo. Alternatívne môžu byť všetky porovnania tiež založené na postkoitálnom čase, aby sa eliminovali chybné údaje o postnatálnom vývoji v dôsledku rozdielov v dĺžke trvania gravidity. Zaznamenať však treba aj časové údaje vo vzťahu k pôrodu. To je obzvlášť dôležité, keď testovaná chemikália ovplyvňuje dĺžku trvania gravidity.

Parametre potomstva

44. Každý vrh je potrebné vyšetriť čo najskôr po pôrode (0. alebo 1. PND), aby sa zistil počet a pohlavie mláďat, mŕtvo narodených a živo narodených jedincov a výskyt nápadných anomálií (navonok viditeľné abnormality vrátane rázštepov podnebia, podkožné hemorágie, abnormálna farba alebo textúra kože, prítomnosť pupočnej šnúry, nedostatok mlieka v žalúdku, prítomnosť vyschnutých sekrétov). Prvé klinické vyšetrenie novorodencov zahŕňa kvalitatívne posúdenie telesnej teploty, stavu aktivity a reakcií na manipuláciu. Mláďatá, ktoré sa našli mŕtve v 0. PND alebo neskôr, je potrebné vyšetriť na možné defekty a príčinu uhynutia. Živé mláďatá sa spočítajú a každé sa jednotlivo odváži v 0. alebo 1. PND a potom pravidelne, napríklad vo 4., 7., 14. a 21. PND. Klinické vyšetrenia zodpovedajúce veku zvierat sa opakujú pri vážení potomstva, alebo v prípade osobitných zistení pri

pôrode aj častejšie. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria vonkajšie abnormality, zmeny na koži, kožušine, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity, ale uvedený výpočet príznakov nie je vyčerpávajúci. Zmeny chôdze, postoja a reakcie na manipuláciu, ako aj prítomnosť šklbavých pohybov alebo svalové napätie, stereotypné alebo výstredné správanie je nutné tiež zaznamenať.

45. Anogenitálna vzdialenosť každého mláďaťa sa odmeria najmenej raz medzi 0. a 4. PND. V deň merania anogenitálnej vzdialenosti sa zisťuje aj telesná hmotnosť mláďaťa a anogenitálna vzdialenosť sa normalizuje na mieru veľkosti mláďaťa, najlepšie na tretiu odmocninu telesnej hmotnosti (12). Prítomnosť prsných bradaviek/dvorcov prsných bradaviek u samčích mláďať sa kontroluje v 12 alebo 13. PND.
46. U všetkých vybraných zvierat generácie F₁, sa denne hodnotí oddelenie žalúda a predkožky u samcov a otvorenie vagíny u samíc, a to so začiatkom pred očakávaným dňom dosiahnutia týchto sledovaných parametrov, aby sa zistilo, či k pohlavnej zrelosti dôjde skoro. Všímať si treba akékoľvek abnormality pohlavných orgánov, ako je trvalé nedostatočné otvorenie vagíny, hypospádia alebo rásžtep penisu. Pohlavná zrelosť zvierat generácie F₁ sa porovnáva s fyzickým vývojom určením veku a telesnej hmotnosti v čase oddelenia žalúda a predkožky u samcov a otvorenia vagíny u samíc (13).

Posúdenie potenciálnej vývojovej neurotoxicity (kohorty 2A a 2B)

47. Na posúdenie neurotoxicity sa použije 10 samcov a 10 samíc z kohorty 2A a 10 samcov a 10 samíc z kohorty 2B, z každej testovanej skupiny (pre každú kohortu: 1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber). Zvieratá z kohorty 2A sa podrobia posúdeniu sluchovej citlivosti, funkčnej pozorovacej batérie, posúdeniu motorickej aktivity (pozri odseky 48 – 50), a neuropatologickému posúdeniu (pozri odseky 74 – 75). Je potrebné vynaložiť úsilie, aby sa zabezpečilo, že zmeny všetkých testovacích podmienok budú minimálne a nie systematicky súvisiace s ošetrením. K premenným, ktoré môžu ovplyvňovať správanie, patrí hladina zvuku (napríklad krátkodobý hluk), teplota, vlhkosť, osvetlenie, zápach, denná doba a narušenie životného prostredia. Výsledky testov na neurotoxicitu sa interpretujú vo vzťahu k príslušným historickým kontrolným referenčným rozsahom. Zvieratá kohorty 2B sa použijú na neuropatologické posúdenie v 21. alebo 22. PND (pozri odseky 74 – 75).
48. Test sluchovej citlivosti sa vykoná v 24. (± 1) PND s použitím zvierat z kohorty 2A. Deň testovania je potrebné stanoviť vyvážené pre všetky testované a kontrolné skupiny. Každá séria pozostáva z 50 pokusov. Pri vykonávaní testu sluchovej citlivosti sa určí stredná amplitúda odozvy v každom bloku po 10 pokusov (5 blokov po 10 pokusov), pričom podmienky testu sa optimalizujú tak, aby sa v rámci série vytvoril návyk. Tieto postupy musia byť v súlade s testovacou metódou B.53 (35).
49. Vo vhodnom čase medzi 63. a 75. PND sa zvieratá z kohorty 2A podrobia funkčnej pozorovacej batérii a automatickému testu motorickej aktivity. Tieto postupy musia byť v súlade s testovacími metódami B.43 (33) a B.53 (35). Funkčná pozorovacia batéria zahŕňa podrobný opis vzhľadu, správania a funkčnej integrity subjektu. Tieto prvky sa posudzujú prostredníctvom pozorovaní v domácej klietke, po presunutí do zvyčajnej vyšetrovacej miestnosti na pozorovanie (otvorené pole), kde sa zviera voľne pohybuje, a prostredníctvom manipulačného testu. Testovanie pokračuje od najmenej interaktívneho po najviac interaktívne. Zoznam opatrení je uvedený v dodatku 1. Starostlivé pozorovanie všetkých zvierat vykonávajú vyškolení pracovníci, ktorí nie sú oboznámení so stavom testovania zvierat, pričom používajú normované postupy s cieľom minimalizovať variabilitu pozorovateľov. Ak je to možné, odporúča sa, aby ten istý pozorovateľ hodnotil zvieratá v danom teste. Ak to nie je možné, vyžaduje sa určité preukázanie spoľahlivosti medzi pozorovateľmi. Pre každý parameter v batérii testov na správanie sa musia použiť presne prevádzkovo definované stupnice a kritériá hodnotenia. Ak je to možné, vypracujú sa objektívne kvantitatívne miery pre pozorované parametre, ktoré zahŕňajú aj subjektívne hodnotenie. V prípade motorickej aktivity sa každé zviera testuje individuálne. Séria testov má byť dostatočne dlhá, aby sa v rámci série ukázal návyk na kontrolu. Motorická aktivita sa monitoruje automatickým zariadením na záznam aktivity, ktoré musí byť schopné zistiť nárast aj pokles aktivity (t. j. základná aktivita, ktorú meria zariadenie, nesmie byť nastavená tak nízko, aby nebolo možné sledovať pokles, ani tak vysoko, aby nebolo možné sledovať nárast aktivity). Každé zariadenie sa testuje štandardnými postupmi, aby sa v najväčšej možnej miere zabezpečila spoľahlivosť prevádzky všetkých zariadení po celý čas. Pokiaľ je to možné, testované skupiny majú byť vyvážené pre všetky zariadenia. Testované skupiny by mali byť vyvážené po celý čas, aby sa predišlo zmätkom v dôsledku denného rytmu aktivity.
50. Ak sa existujúcimi informáciami preukáže potreba ďalšieho funkčného testovania (napríklad senzorického, sociálneho, kognitívneho), toto testovanie sa musí integrovať tak, aby nebola narušená integrita ostatných hodnotení vykonávaných v rámci štúdie. Ak sa toto testovanie vykonáva na tých istých zvieratách, ktoré sa používajú na štandardný test sluchovej citlivosti, funkčnú pozorovaciu batériu a test motorickej aktivity, iné testy musia byť

naplánované tak, aby sa minimalizovalo riziko narušenia integrity pôvodných testov. Doplňujúce postupy môžu byť zvlášť užitočné, keď empirické pozorovanie, očakávané účinky alebo mechanizmus/spôsob pôsobenia poukazuje na konkrétny druh neurotoxicity.

Posúdenie potenciálnej vývojovej imunotoxicity (kohorta 3)

51. Na 56. ($\pm$ 3) PND sa použije 10 samcov a 10 samíc z kohorty 3, z každej testovanej skupiny (1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber), v teste protilátkovej reakcie závislej od T-buniek, t. j. primárnej reakcie protilátky IgM na antigén závislý od T-buniek, ako je napríklad ovčí erytrocyt SRBC (Sheep Red Blood Cell) alebo ušticový hemocyanín KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), v súlade so súčasnými postupmi testovania imunotoxicity (14), (15). Reakcia sa môže hodnotiť počítaním osobitných buniek tvoriacich plaky (plaque-forming cells – PFC) v slezine, alebo stanovením titra protilátky IgM, špecificky pre SRBC alebo KLH, v sére pomocou imuno-enzymatickej metódy ELISA, pri maximálnej reakcii. Reakcie dosahujú maximum spravidla štyri (reakcia PFC) alebo päť (metóda ELISA) dní po intravenózne imunizácii. Ak sa primárna protilátková reakcia testuje počítaním plakotvorných buniek, je prípustné hodnotiť podskupiny zvierat v rôzne dni za predpokladu, že: imunizácia a usmrtenie skupiny sa načasuje tak, že plakotvorné bunky sa počítajú pri maximálnej reakcii; že podskupina pozostáva z rovnakého počtu samcov a samíc potomstva zo všetkých dávkových skupín vrátane kontrolných, a že podskupiny sa hodnotia v približne rovnakom postnatálnom veku. Expozícia účinkom testovanej chemikálie bude pokračovať do dňa pred odberom slezín pre hodnotenie reakcie PFC alebo séra pre test ELISA.

Následné posúdenie potenciálnej reprodukčnej toxicity (kohorta 1B)

52. Zvieratá z kohorty 1B sa môžu uchovávať na testovanie dlhšie ako do 90. PND a chovať, aby sa v prípade potreby získala generácia F₂. Samce a samice z tej istej dávkovej skupiny sa pária (zabráni sa páreniu medzi súrodencami) po dobu až dvoch týždňov so začiatkom v 90. PND alebo neskôr, ale nie dlhšie ako do 120. PND. Postupy sú podobné ako v prípade zvierat generácie P. Na základe závažných dôkazov však môže postačovať ukončenie vrhu vo 4. PND, namiesto jeho sledovania do odstavenia alebo ešte dlhšie.

POZOROVANIA PO USMRTENÍ

Klinická biochémia/hematológia

53. Systémové účinky sa monitorujú u zvierat generácie P. Vzorky krvi zo stanovených miest sa rýchlo odoberú u desiatich náhodne vybraných samcov a samíc generácie P z každej dávkovej skupiny po usmrtení, uskladnia sa vo vhodných podmienkach a podrobia sa čiastočným alebo úplným hematologickým vyšetreniam, vyšetreniam klinickej biochémie, testom na T4 a TSH alebo iným vyšetreniam, ktoré vyplývajú zo známeho profilu účinkov testovanej chemikálie (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Vyšetrujú sa tieto hematologické parametre: hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenčný počet leukocytov, počet krvných doštičiek a čas/potenciál zrážanlivosti krvi. Vyšetrenia plazmy alebo séra zahŕňajú: glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkové proteíny, albumín a najmenej dva enzýmy indukujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, alkalická fosfatáza, gamaglutamyl-transpeptidáza a sorbitol-dehydrogenáza). Meranie ďalších enzýmov a žľových kyselín môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie. Okrem toho sa krv od všetkých zvierat môže odobrať a uložiť na možné analýzy v neskoršom období, ktoré by pomohli vyjasniť nejednoznačné účinky alebo vytvorili údaje o vnútornej expozícii. Ak sa neuvážuje o druhom párení zvierat generácie P, vzorky krvi sa získajú pred postupom plánovaného usmrtenia, alebo ako súčasť tohto postupu. V prípade, že sa zvieratá zachovávajú, vzorky krvi sa odoberú niekoľko dní pred ich druhým párením. Pokiaľ existujúce údaje zo štúdií s opakovanými dávkami nenaznačujú, že testovaná chemikália nemá účinok na daný parameter, pred usmrtením sa vykoná vyšetrenie moču a hodnotia sa tieto parametre: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická hmotnosť, pH, proteíny, glukóza, krv a krvné bunky, bunkový odpad. Moč sa môže odobrať s cieľom monitorovať exkréciu testovanej chemikálie a/alebo metabolitu (metabolitov).
54. Systémové účinky sa monitorujú u zvierat generácie F₁. Vzorky krvi zo stanovených miest sa rýchlo odoberú u desiatich náhodne vybraných samcov a samíc z kohorty 1A, z každej dávkovej skupiny po usmrtení, uskladnia sa vo vhodných podmienkach a podrobia sa štandardným vyšetreniam klinickej biochémie vrátane posúdenia hladín séra pre tyroidné hormóny (T4 a TSH), hematologickým vyšetreniam (celkový a diferenčný počet leukocytov a erytrocytov) a vyšetreniam moču.

55. Nadbytočné mláďatá sa vo 4. PND podrobia makroskopickej pitve a pozornosť sa venuje meraniu koncentrácií séra pre tyroidný hormón (T4). V prípade potreby sa neonatálna krv (zo 4. PND) môže združovať podľa vrhu na biochemické analýzy/analýzy tyroidného hormónu. Krv sa odoberá aj na analýzy hormónov T4 a TSH od odstavených mláďat, ktoré sa podrobia makroskopickej pitve v 22. PND (mláďatá generácie F₁, ktoré neboli vybrané do kohort).

Parametre spermií

56. Parametre spermií sa merajú u všetkých samcov generácie P, pokiaľ existujúce údaje neukazujú, že počas 90-dňovej štúdie nebol zaznamenaný účinok na parametre spermií. Vyšetrenia parametrov spermií sa vykonávajú u všetkých samcov kohorty 1As.
57. Pre všetky samce generácie P a F₁ (kohorta 1A) sa po usmrtení zaznamená hmotnosť semenníkov a nadsemenníkov. Najmenej jeden semenník a jeden nadsemenník sa odložia na histopatologické vyšetrenie. Zostávajúce nadsemenníky sa použijú na vyčíslenie zásob spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (16), (17). Spermie z chvostovej časti nadsemenníkov (alebo semenovodov) sa okrem toho odoberú pomocou metód, ktoré minimalizujú poškodenie, na vyšetrenie pohyblivosti a morfológie spermií (18).
58. Pohyblivosť spermií sa môže hodnotiť buď okamžite po usmrtení, alebo zaznamenať pre neskoršiu analýzu. Podiel progresívne pohyblivých spermií sa dá určiť subjektívne alebo objektívne analýzou pohybu pomocou počítača (19), (20), (21), (22), (23), (24). Pri hodnotení morfológie spermií sa vzorka spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (alebo semenovodu) vyšetrí ako fixné alebo mokré preparáty (25) a minimálne 200 spermií na vzorku sa zatriedi ako buď normálne (hlavička aj stredná časť/bičík majú normálny vzhľad), alebo abnormálne. Príklady morfológických abnormalít spermií zahŕňajú fúziu, oddelené hlavičky a zdeformované hlavičky a/alebo bičíky (26). Zdeformované alebo veľké hlavičky spermií môžu poukazovať na poruchy v tvorbe spermií.
59. Ak sú vzorky spermií zmrazené, stery odobraté a obrázky z analýzy mobility spermií zaznamenané v čase pitvy (27), následná analýza sa môže obmedziť na kontrolnú skupinu a skupinu samcov s vysokou dávkou. Ak sa však pozorujú účinky v súvislosti s testovaním, hodnotia sa aj skupiny s nižšími dávkami.

Makroskopická pitva

60. V čase usmrtenia alebo predčasného úhynu sa u všetkých zvierat generácie P a F₁ vykoná pitva a vyšetrenie na akékoľvek štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Moribundné mláďatá, ktoré sa humánnym spôsobom usmrtia, ako aj uhynuté mláďatá sa zaznamenávajú, a ak nie sú macerované, vyšetrí sa na možné defekty a/alebo príčinu uhynutia a zakonzervujú sa.
61. U dospelých samíc generácií P a F₁ sa v deň pitvy vyšetrí vaginálny ster, aby sa určilo štádium estrálneho cyklu a umožnilo určenie korelácie s histopatológiou v reprodukčných orgánoch. Maternice všetkých samíc generácie P (a v prípade potreby aj samíc generácie F₁) sa vyšetrí na prítomnosť a počet implantačných miest spôsobom, ktorý neohrozí histopatologické hodnotenie.

Hmotnosť orgánov a uchovanie tkanív – dospelé zvieratá generácie P a F₁

62. V čase usmrtenia sa určí telesná hmotnosť a mokrá hmotnosť nižšie uvedených orgánov všetkých zvierat generácie P a všetkých dospelých zvierat generácie F₁ z príslušných kohort (ako je uvedené ďalej), a to čo najskôr, aby sa predišlo vysychaniu. Tieto orgány sa potom uchovávajú vo vhodných podmienkach. Pokiaľ nie je uvedené inak, párové orgány sa môžu vážiť jednotlivo alebo kombinovane, v súlade s bežnou praxou testovacieho laboratória.

— Maternica (s vajcovodmi a krčkom maternice), vaječníky.

— Semenníky, nadsemenníky (celé a chvostová časť na vzorky, ktoré sa použijú pri počítaní spermií).

— Prostata (kombinácia dorzolaterálnych a ventrálnych častí). Pri odrezávaní komplexu prostaty je potrebná opatrnosť, aby sa zabránilo perforácii semenných vachov naplnených tekutinou. V prípade účinku súvisiaceho s testom na celkovú hmotnosť prostaty je potrebné po fixácii starostlivo oddeliť dorzolaterálne a ventrálné časti a vážiť ich osobitne.

- Semenné vaky s koagulačnými žľazami a ich tekutinami (ako jedna jednotka).
 - Mozog, pečeň, obličky, srdce, slezina, týmus, hypofýza, štítna žľaza (po fixácii), nadobličky a známe cieľové orgány a tkanivá.
63. Okrem uvedených orgánov sa vo vhodných podmienkach uchovávajú vzorky periférnych nervov, svalov, miechy, oka s očným nervom, gastrointestinálneho traktu, močového mechúra, pľúc, priedušnice (s pripojenou štítnou žľazou a prítútnou žľazou), kostnej drene, semenovodov (samce), mliečnych žliaz (samce a samice) a vagíny.
64. Všetky orgány zvierat z kohorty 1A sa odvážia a uchovávajú pre histopatológiu.
65. Pri vyšetrení prenatálne a postnatálne vyvolaných imunotoxických účinkov sa 10 samcov a 10 samíc z kohorty 1A, z každej testovanej skupiny (1 samec alebo 1 samica na vrh; každý vrh je zastúpený najmenej jedným mláďaťom; náhodný výber) sa po usmrtení podrobí týmto úkonom:
- váženie lymfatických uzlín, spojených s cestou expozície aj vzdialených od tejto cesty (na doplnenie hmotnosti nadobličiek, týmusu a sleziny, ktorá už bola zisťovaná u všetkých zvierat kohorty 1A)
 - analýza subpopulácie slezinových lymfocytov (CD4+ a CD8+ T-lymfocyty, B-lymfocyty a „prirodzené zabíjači“) s použitím polovice sleziny, pričom druhá polovica sleziny sa uchová na histopatologické hodnotenie.
- Analýzou subpopulácií slezinových lymfocytov z neimunizovaných zvierat (kohorta 1A) sa určí, či expozícia súvisí s posunom stabilnej imunologickej distribúcie lymfocytov vznikajúcich v týmuse – „pomocníka“ (CD4+) alebo cytotoxického lymfocytu (CD8+), prípadne „prirodzených zabíjačov“ (natural killer – NK) (rýchle reakcie na neoplastické bunky a patogény).
66. U zvierat z kohorty 1B sa tieto orgány odvážia a zodpovedajúce tkanivá sa spracujú do blokovej fázy:
- vagína (neváži sa)
 - maternica s krčkom matrice
 - vaječníky
 - semenníky (najmenej jeden)
 - nadsemenníky
 - semenné vaky a koagulačné žľazy
 - prostata
 - hypofýza
 - známe cieľové orgány

Histopatologické vyšetrenia sa v kohorte 1B vykonávajú, ak výsledky z kohorty 1A sú nejednoznačné, alebo v prípadoch podozrivých reprodukčne alebo endokrinne toxických látok.

67. Kohorty 2A a 2B: testovanie vývojovej neurotoxicity (21. alebo 22. PND a dospelé potomstvo). Zvieratá z kohorty 2A sa usmrtnia po testovaní správania, pričom sa zaznamená hmotnosť ich mozgu a vykonajú sa úplné neurohistopatologické vyšetrenia na účely posúdenia neurotoxicity. Zvieratá z kohorty 2B sa usmrtnia v 21. alebo 22. PND, pričom sa zaznamená hmotnosť ich mozgu a vykoná sa mikroskopické preskúmanie mozgu na účely posúdenia neurotoxicity. U zvierat z kohorty 2A a voliteľne z kohorty 2B sa vyžaduje fixovanie premývaním, ako je uvedené v testovacej metóde B.53 (35).

Hmotnosť orgánov a uchovanie tkanív – odstavené mláďatá generácie F₁

68. Mláďatá, ktoré neboli vybrané do kohort, vrátane nevyvinutých jedincov, sa usmrtnia po odstavení, v 22. PND, pokiaľ výsledky nepoukazujú na potrebu ďalších analýz počas života. Usmrtené mláďatá sa podrobia makroskopickému pite vrátane posúdenia reprodukčných orgánov, ako je opísané v odsekoch 62 a 63. U desiatich mláďat na skupinu, z oboch pohlaví a z čo najväčšieho počtu vrhov, sa odvážia a vo vhodných podmienkach uchová mozog, slezina a týmus. Okrem toho sa môžu uchovávať prsné tkanivá týchto samčích a samičích mláďat na ďalšiu mikroskopickú analýzu⁽¹⁾ (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Výrazné abnormality a cieľové tkanivá sa uchovávajú na prípadné histologické vyšetrenie.

⁽¹⁾ Výskum ukázal, že mliečne žľazy, predovšetkým v raných štádiách vývoja, sú citlivými sledovanými parametrami pre činnosť estrogénov. Odporúča sa, aby sledované parametre týkajúce sa mliečnych žliaz mláďat oboch pohlaví boli po validácii zahrnuté do tejto testovacej metódy.

Histopatológia – zvieratá generácie P

69. Úplné histopatologické vyšetrenie orgánov uvedených v odsekoch 62 a 63 sa vykoná u všetkých zvierat generácie P s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny. Orgány, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, sa vyšetrí aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Ďalej sa podrobia histopatologickému vyšetreniu reprodukčné orgány všetkých zvierat s podozrením na zníženie fertility, napríklad tých, ktoré zlyhali pri párení, počatí, plodení alebo vrhnutí zdravého potomstva, alebo u ktorých bol ovplyvnený estrálny cyklus prípadne počet, pohyblivosť alebo morfológia spermií.

Histopatológia – zvieratá generácie F₁*Zvieratá z kohorty 1*

70. Úplné histopatologické vyšetrenie orgánov uvedených v odsekoch 62 a 63 sa vykoná u všetkých dospelých zvierat z kohorty 1A s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny. Každý vrh by mal byť zastúpený najmenej jedným mláďaťom oboch pohlaví. Orgány a tkanivá, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, a všetky výrazné lézie sa vyšetrí aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hodnoty NOAEL. Na vyhodnotenie účinkov na lymfoidné orgány vyvolaných v prenatalnom a postnatalnom období sa vykoná aj histopatologické vyšetrenie odobratých lymfatických uzlín a kostnej drene od 10 samcov a 10 samíc z kohorty 1A, čím sa doplnia histopatologické vyšetrenia týmusu, sleziny a nadobličiek, ktoré už boli vykonané u všetkých zvierat kohorty 1A.
71. Reprodukčné a endokrinné tkanivá od všetkých zvierat z kohorty 1B, spracované do blokovej fázy, ako je opísané v odseku 66, sa podrobia histopatologickému vyšetreniu v prípadoch podozrivých reprodukčných alebo endokrinných toxických látok. Histologickému vyšetreniu sa podrobia aj zvieratá z kohorty 1B, ak výsledky z kohorty 1A nebudú jednoznačné.
72. Vaječníky dospelých samíc majú obsahovať primordiálne a rastúce folikuly, ako aj veľké žlté teliesko. Histopatologické vyšetrenie sa preto zameria na kvantitatívne hodnotenie primordiálnych a malých rastúcich folikulov, ako aj veľkého žltého telieska, v telách samíc generácie F₁, pričom počet zvierat, výber rezu vaječníkov a výber veľkosti vzoriek má byť štatisticky primeraný na posúdenie použitej metódy. Stanovenie počtu folikulov sa môže najskôr vykonať u zvierat z kontrolnej skupiny a s vysokou dávkou a v prípade negatívneho účinku na zvieratá s vysokou dávkou sa vyšetrenie vykoná pri nižších dávkach. Do vyšetrenia sa zahrnie stanovenie počtu primordiálnych folikulov, ktoré sa môžu kombinovať s malými rastúcimi folikulmi na porovnanie vaječníkov testovaných a kontrolných samíc (pozri usmerňovací dokument OECD 151 (40)). Posudzovanie veľkého žltého telieska sa vykonáva súbežne s testovaním estrálneho cyklu, preto sa pri posudzovaní môže zohľadniť fáza cyklu. Vajcovod, maternica a vagína sa vyšetrujú na primeranosť vývoja zodpovedajúcu danému orgánu.
73. U samcov generácie F₁ sa vykonávajú podrobné testikulárne histopatologické vyšetrenia s cieľom zistiť účinky, súvisiace s testovaním, na diferenciáciu a vývoj semenníkov a na spermatogézu (38). Ak je to možné, treba vyšetriť rezy rete testis. Hlava, telo a chvostová časť nadsemenníkov a semenovody sa vyšetrujú na primeranosť vývoja zodpovedajúcu danému orgánu a zisťujú sa aj parametre požadované u samcov generácie P.

Zvieratá z kohorty 2

74. Neurohistopatologické vyšetrenie sa vykoná u všetkých zvierat oboch pohlaví z kohorty 2A s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny po ukončení neurobehaviorálnych testov (po 75. PND, ale nie neskôr ako v 90. PND). Histopatologické vyšetrenie mozgu sa vykoná u všetkých zvierat oboch pohlaví z kohorty 2B s vysokou dávkou a z kontrolnej skupiny v 21. alebo 22. PND. Orgány alebo tkanivá, ktoré vykazujú zmeny súvisiace s testovaním, sa vyšetrí aj u všetkých zvierat v skupinách s nižšou dávkou, čo pomôže pri určovaní hodnoty NOAEL. U zvierat z kohorty 2A a 2B sa skúmajú viaceré rezy mozgu, čo umožní vyšetriť čuchovú guľu, mozgovú kôru, hipokampus, bazálne gangliá, talamus, hypotalamus, stredný mozog (schránka, pokrývka, mozgové stopky), mozgový kmeň a mozoček. Iba v prípade kohorty 2A sa vyšetrujú oči (sietnica a zrkový nerv) a vzorky periférnych nervov, svalov a miechy. Všetky neurohistologické postupy musia byť v súlade s testovacou metódou B.53 (35).
75. Reprezentatívne oblasti mozgu (homologické rezy starostlivo vybrané na základe spoľahlivých mikroskopických rozhraní) podliehajú morfometrickým (kvantitatívnym) hodnoteniam, ktoré môžu zahŕňať lineárne a/alebo plošné merania konkrétnych oblastí mozgu. Z každého rozhrania (úrovne) je potrebné odobrať najmenej tri po sebe idúce rezy, aby sa dal vybrať najhomologickejší a najreprezentatívnejší rez z každej konkrétnej oblasti mozgu, ktorá sa má hodnotiť. Neuropatológ urobí posudok, či rezy pripravené na meranie sú homologické s ostatnými

v súbore vzoriek a teda vhodné na zahrnutie, keďže podmienky najmä lineárneho merania sa môžu meniť na pomerne krátkej vzdialenosti (28). Nehomologické rezy sa nepoužívajú. Hoci cieľom je odobrať vzorky zo všetkých zvierat vyhradených na tento účel (10/pohlavie/úroveň dávky), aj nižšie počty môžu byť primerané. Počet vzoriek od menej než 6 zvierat/pohlavie/úroveň dávky sa však vo všeobecnosti nepovažuje za dostatočný na účely tejto testovacej metódy. Na identifikáciu účinkov súvisiacich s testovaním na parametre, ako je objem alebo počet buniek pre konkrétne neuroanatomické oblasti, sa môže použiť stereológia. Všetky aspekty prípravy vzoriek tkaniva, od fixácie tkaniva, cez vyrezanie vzoriek tkaniva, spracovanie tkaniva až po farbenie sklíčok musia mať vyváženú štruktúru tak, aby všetky súbory obsahovali reprezentatívne vzorky z každej dávkovej skupiny. Ak sa majú použiť morfometrické alebo stereologické analýzy, mozgové tkanivo je potrebné uložiť do vhodného média pre všetky hladiny dávky v tom istom čase, aby sa predišlo zmršteniu štruktúry buniek spojenému s predĺženým uložením vo fixačnom prostriedku.

PREDKLADANIE SPRÁV

Údaje

76. Údaje sa zaznamenávajú jednotlivo a sumarizujú vo forme tabuliek. Pre každú testovanú skupinu a každú generáciu sa v správe uvedú podľa možnosti tieto údaje: počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu, alebo boli usmrtené z humanných dôvodov, čas každého úmrtia alebo humanného usmrtenia, počet plodných zvierat, počet gravidných samíc, počet samíc, ktoré vrhli mláďatá a počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity. Potrebné je uviesť aj opis toxicity vrátane času nástupu, trvania a závažnosti.
77. Číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy sa zvolia ako súčasť plánu štúdie a musia primerane riešiť otázky nenormálnych dát (napríklad údaje o počte), cenzurovaných dát (napríklad obmedzená doba pozorovania), závislosti (napríklad vplyvy vrhu a opakované merania) a nerovnakého rozptylu. Zovšeobecnené lineárne zmiešané modely a modely dávka – reakcia zahŕňajú širokú škálu analytických nástrojov, ktoré môžu byť vhodné pre údaje získané v rámci tejto metódy. Správa obsahuje dostatok informácií o analytickej metóde a použitom počítačovom programe, aby nezávislý posudzovateľ/štatistik mohol vyhodnotiť a prehodnotiť analýzu.

Vyhodnotenie výsledkov

78. Zistenia sa môžu vyhodnotiť z hľadiska pozorovaných účinkov, a to vrátane zistení z pitvy a mikroskopických zistení. Hodnotenie zahŕňa vzťah medzi dávkou a výskytom, dôsledkami a závažnosťou abnormalít vrátane výrazných lézií, alebo neexistenciu takého vzťahu. Posúdiť treba aj otázky cieľových orgánov, plodnosti, klinických abnormalít, činností reprodukcie a rodenia, zmien telesnej hmotnosti, mortality a ďalších toxických a vývojových účinkov. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zmenám špecifickým pre jednotlivé pohlavia. Pri hodnotení výsledkov testu treba zväziť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie a údaje o timidínovej kináze vrátane placentárneho prenosu a exkrécie do mlieka, ak sú tieto údaje k dispozícii.

Správa o teste

79. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie získané v danej štúdii o zvieratách generácií P a F₁ a o zvieratách generácie F₂ (v prípade potreby):

Testovaná chemikália:

- všetky dôležité dostupné údaje o chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastnostiach testovanej chemikálie,
- identifikačné údaje,
- čistota;

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda;

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, materiál na hniezdenie atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu,
- údaje o vaginálnych steroch u samíc generácie P pre začiatkom testovania (ak sa údaje v tom čase získavali),
- záznamy o párení generácie P, v ktorých sú označení páriaci sa partneri, samec a samica, a tiež úspešný výsledok párenia,
- vrh z pôvodných záznamov o dospelých zvieratách generácie F_1 ;

Podmienky testu:

- zdôvodnenie výberu hladiny dávok,
- podrobné údaje o zložení testovanej chemikálie/príprave krmiva, dosiahnutých koncentráciách,
- stabilita a homogénnosť prípravku v nosiči (napríklad v krmive, pitnej vode), v krvi a/alebo mlieku pri splnení podmienok použitia a uskladnenia v prestávke medzi obdobiami používania,
- podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie,
- prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na dosiahnutú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), v prípade potreby,
- podrobné údaje o kvalite potravy a vody (vrátane zloženia krmiva, ak sú údaje k dispozícii),
- podrobný opis postupov náhodného výberu mláďat na vyradenie a náhodného zaraďovania mláďat do testovaných skupín,
- podmienky prostredia,
- zoznam pracovníkov realizujúcich štúdiu vrátane odbornej prípravy;

Výsledky (súhrn a individuálne údaje podľa pohlavia a dávky):

- spotreba potravy, spotreba vody (ak sú údaje k dispozícii), účinnosť potravy (prírastok telesnej hmotnosti na gram skonzumovanej potravy, okrem obdobia párenia a laktácie) a spotreba testovanej chemikálie (pri podávaní krmiva/pitnej vody) pre zvieratá generácie P a F_1 ,
- údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii);
- údaje o telesnej hmotnosti zvierat generácie P,
- údaje o telesnej hmotnosti vybraných zvierat generácie F_1 po odstavení,
- čas uhynutia počas štúdie alebo údaj, či zvieratá prežili do usmrtenia,
- charakter, trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),
- údaje z hematologických vyšetrení, vyšetrení moču a klinickej biochémie vrátane údajov o hormónoch TSH a T4,
- fenotypická analýza buniek sleziny (T-, B-, NK-bunky),
- bunečnosť kostnej drene,
- údaje o toxikkej reakcii,
- počet samíc generácie P a F_1 s normálnym alebo abnormálnym estrálnym cyklom a trvanie cyklu,
- čas párenia (predkoitálny interval, počet dní medzi spárovaním a párením),
- toxické alebo iné účinky na reprodukciu vrátane počtov a percentuálnych podielov zvierat, ktoré zvládli párenie, graviditu, pôrod a laktáciu, samcov, ktorí vyvolali graviditu, samíc s príznakmi dystokie/dlhého alebo ťažkého pôrodu,
- doba trvania gravidity a pôrodu, ak je údaj k dispozícii,
- počet implantácií, veľkosť vrhu a percentuálny podiel samčích mláďat,

- počet a percentuálny podiel poimplantačných strát, živo narodených a mŕtvo narodených jedincov,
- údaje o hmotnosti vrhu a jednotlivých mláďat (samcov, samíc a kombinovane), počet nevyvinutých jedincov, ak bol zistený,
- počet mláďat s výrazne viditeľnými abnormalitami,
- toxické alebo iné účinky na potomstvo, postnatálny rast, životaschopnosť atď.,
- údaje o fyzických medzníkoch vo vývoji mláďat a iné postnatálne údaje o vývoji,
- údaje o pohlavnej zrelosti zvierat generácie F_1 ,
- údaje o vyšetreniach funkčnosti u mláďat a dospelých jedincov, ak je to možné,
- telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o absolútnych a relatívnych hmotnostiach orgánov zvierat generácie P a dospelých zvierat generácie F_1 ,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
- celkový počet spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, percentuálny podiel progresívne sa pohybujúcich spermií, percentuálny podiel morfológicky normálnych spermií a percentuálny podiel spermií s každou identifikovanou abnormalitou u samcov generácií P a F_1 ,
- počet a štádium zrelosti folikulov obsiahnutých vo vaječníkoch samíc generácií P a F_1 , ak je to vhodné,
- vyčíslenie počtu veľkých žltých teliesok (corpora lutea) vo vaječníkoch samíc generácie F_1 ,
- štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Parametre kohorty 2:

- podrobný opis postupov používaných na normovanie vyšetrení a postupov, ako aj prevádzkové vymedzenia pojmov pre hodnotiace vyšetrenia,
- zoznam všetkých použitých testovacích postupov a odôvodnenie ich použitia,
- podrobné údaje o použitých behaviorálnych/funkčných, neuropatologických a morfometrických postupoch vrátane informácií a podrobných údajov o automatických zariadeniach,
- postupy na kalibráciu a zabezpečenie rovnocennosti zariadení, ako aj vyváženie testovacích skupín v rámci testovacích postupov,
- krátke odôvodnenie, ktorým sa vysvetľuje každé rozhodnutie obsahujúce odborný posudok,
- podrobný opis všetkých behaviorálnych/funkčných, neuropatologických a morfometrických nálezov podľa pohlavia a dávkovej skupiny vrátane nárastu a poklesu v kontrolnej skupine,
- hmotnosť mozgu,
- každá diagnóza stanovená na základe neurologických príznakov a lézií vrátane prirodzene vznikajúcich chorôb alebo podmienok,
- obrázky exemplárnych nálezov,
- obrázky s nízkou energiou na posúdenie homológie častí používaných na morfometriu,
- štatistické spracovanie výsledkov vrátane štatistických modelov používaných na analyzovanie údajov a výsledkov bez ohľadu na to, či boli významné alebo nie,
- vzťah iných toxických účinkov k záveru o neurotoxickom potenciáli testovanej chemikálie podľa pohlavia a dávkovej skupiny,
- vplyv akejkoľvek toxikokinetickej informácie na závery,
- údaje podporujúce spoľahlivosť a citlivosť testovacej metódy (t. j. pozitívne a historické kontrolné údaje),
- vzťahy, ak nejaké sú, medzi neuropatologickými a funkčnými účinkami,
- hodnota NOAEL alebo referenčná dávka pre samice a potomstvo, podľa pohlavia a dávkovej skupiny,
- diskusia celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane záveru o tom, či chemikália spôsobila vývojovú neurotoxickosť alebo nie, a na základe hodnoty NOAEL;

Parametre kohorty 3:

- titer séra protilátky IgM (senzibilizácia na SRBC alebo KLH) alebo slezinové jednotky IgM PFC (senzibilizácia na SRBC),
- vykonávanie metódy TDAR musí v rámci procesu optimalizácie potvrdiť laboratórium pri prvej príprave testu a periodicky (napríklad raz ročne) všetky laboratória,
- diskusia celkovej interpretácie údajov na základe výsledkov vrátane záveru o tom, či chemikália spôsobila vývojovú imunotoxicitu alebo nie, a na základe hodnoty NOEL.

*Rozbor výsledkov**Závery vrátane hodnôt NOEL týkajúce sa účinkov na rodičov a potomstvo*

Predložiť by sa mali aj všetky informácie nezískané počas štúdie, ale užitočné pre interpretáciu výsledkov (napríklad podobnosť účinkov s akýmkoľvek známymi neurotoxínmi).

Interpretácia výsledkov

80. Rozšírená jednogeneračná štúdia reprodukčnej toxicity poskytne podľa potreby informácie o účinkoch opakovanej expozície chemikálií počas všetkých fáz reprodukčného cyklu. Štúdia predovšetkým poskytne informácie o reprodukčnom systéme a o sledovaných faktoroch vývoja, rastu, prežitia a o funkčných faktoroch potomstva do 90. PND.
81. Interpretácia výsledkov štúdie musí zohľadniť všetky dostupné informácie o chemikálii vrátane fyzikálno-chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastností, dostupných dôležitých informácií o štrukturálnych analógiách a výsledkov predchádzajúcich štúdií toxicity testovanej chemikálie (napríklad akútnej toxicity, toxicity po opakovanej aplikácii, štúdie mechanizmov a štúdie posudzujúce, či existujú zásadné kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely medzi druhmi, pokiaľ ide o metabolické vlastnosti in vivo/in vitro). Výsledky makroskopickej pitvy a hmotnosti orgánov sa posúdia v súvislosti so zisteniami z iných štúdií pri opakovaných dávkach, ak je to možné. Pokles vzrastu potomstva sa môže považovať za prejav vplyvu testovanej chemikálie na zloženie mlieka (29).

Kohorta 2 (vývojová neurotoxická)

82. Neurobehaviorálne a neuropatologické výsledky sa interpretujú v súvislosti so všetkými nálezmi, pričom sa využíva prístup váhy dôkazov a odborné posudky. Schémy behaviorálnych alebo morfológických nálezov, ak existujú, ako aj dôkazy o vzťahu medzi dávkou a reakciou je potrebné podrobiť rozboru. Táto charakterizácia by mala zahŕňať aj hodnotenie vývojovej neurotoxicity vrátane epidemiologických štúdií na ľuďoch alebo správ o prípadoch, a tiež experimentálne štúdie zvierat (napríklad toxikokinetické údaje, informácie o štrukturálnej činnosti, údaje z iných štúdií toxicity). Hodnotenie údajov musí zahŕňať aj rozbor biologickej a štatistickej významnosti. Do hodnotenia sa musí zahrnúť aj vzťah, ak existuje, medzi pozorovanými neuropatologickými zmenami a zmenami správania. Usmernenie k interpretácii výsledkov vývojovej neurotoxicity je obsiahnuté v testovacej metóde B.53 (35) a v publikácii Tyla a kol., 2008 (31).

Kohorta 3 (vývojová imunotoxická)

83. Potlačenie alebo posilnenie funkcie imunity, posudzované metódou TDAR (T-cell dependant antibody response – protilátková reakcia závislá od T-buniek), sa musí hodnotiť v súvislosti so všetkými vykonanými pozorovaniami. Význam výsledku testu TDAR môžu podporiť iné účinky na ukazovatele súvisiace s imunológiou (napríklad bunecnosť kostnej drene, hmotnosť a histopatologické vyšetrenie lymfatických tkanív, rozloženie podskupiny lymfocytov). Účinky stanovené metódou TDAR môžu mať menší význam v prípade, že iné toxicity boli pozorované pri nižších koncentráciách expozície.
84. Pomoc pri interpretácii výsledkov skúmania reprodukcie a neurotoxicity poskytne usmerňovací dokument OECD 43 (26).

LITERATÚRA

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 Dimethanesulphonate 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, Paríž.
 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, Paríž.
 33. Kapitola B.43 tejto prílohy, Štúdia neurotoxicity u hlodavcov
 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, Paríž.
 35. Kapitola B.53 tejto prílohy, Štúdia vývojovej neurotoxicity
 36. Kapitola B.54 tejto prílohy, Uterotrofiký biologický test u hlodavcov: Krátkodobý skríningový test na estrogénne vlastnosti
 37. Kapitola B.55 tejto prílohy, Hershbergerov biologický test u potkanov: Krátkodobý skríningový test na (anti)androgénne vlastnosti
 38. OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paríž.
 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, Paríž.
 40. OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paríž.
-

Dodatok č. 1

Kritériá a pozorovania zahrnuté vo funkčnej pozorovacej batérii (kohorta 2a)

Domovská klieťka a otvorený priestor	Manipulácia	Fyziológia
Postoj	Jednoduchosť odstránenia	Teplota
Nedobrovoľné šklbavé pohyby a svalové napätie	Jednoduchosť zaobchádzania	Telesná hmotnosť
Palpebrálne zatvorenie	Svalový tonus	Reakcia zreničky
Piloerekcia	Reakcia na priblíženie	Veľkosť zreničky
Slinenie	Reakcia na dotyk	
Slzenie	Sluchová reakcia	
Vydávanie zvukov	Reakcia na stisnutie chvosta	
Odchov	Polohová reakcia	
Odchýľky chôdze	Slabosť dopadajúcich nôh	
Vzrušenie	Sila zovretia prednými končatinami	
Stereotypy	Sila zovretia zadnými končatinami	
Výstredné správanie		
Škvrny		
Respiračné odchýľky		

Dodatok č. 2

VYMEDZENIA POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes**Testovaná chemikália:** akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy

B.57. SKÚŠKA STEROIDOGENÉZY H295R

ÚVOD

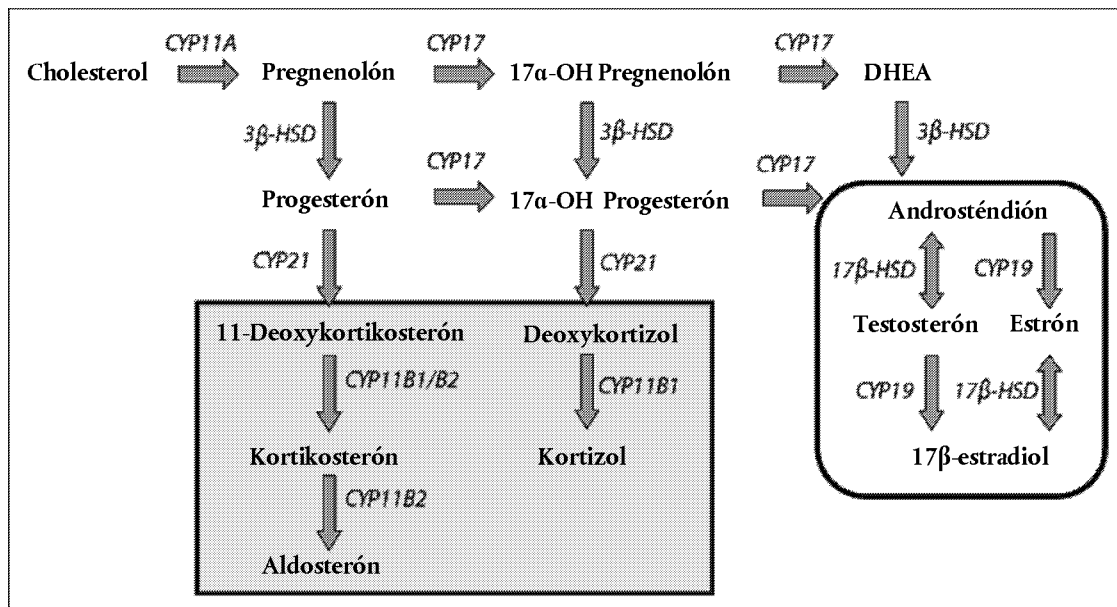
1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 456 (2011). OECD spustila v roku 1998 prioritnú aktivitu na revidovanie a vypracovanie nových usmernení na vykonávanie testov na skrining a testovanie možných chemikálií narúšajúcich endokrinný systém. Konceptný rámec OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií narúšajúcich endokrinný systém z roku 2002 pozostáva z piatich úrovní, pričom každá úroveň zodpovedá inej úrovni biologickej náročnosti (1). Skúška in vitro steroidogenézy H295R (H295R) opísaná v tejto testovacej metóde používa ľudskú bunkovú líniu adrenokarcinómu (bunky NCI-H295R) a predstavuje „skúšku in vitro, ktorá poskytuje mechanistické údaje“ na úrovni 2, ktoré sa používajú na účely skriningu a prioritizácie. Toto testovanie sa na vyšetrenie chemických účinkov na steroidogézu, najmä na produkciu 17 β -estradiolu (E2) a testosterónu (T), vypracovalo a štandardizovalo vo viacerých krokoch. Skúška H295R sa optimalizovala a validovala (2) (3) (4) (5).
2. Cieľom skúšky steroidogenézy H295R je určiť chemikálie, ktoré ovplyvňujú produkciu E2 a T. Skúškou H295R sa majú identifikovať xenobiotiká, ktorých cieľovým miestom/cieľovými miestami sú endogénne zložky, ktoré tvoria vnútrobunkovú biochemickú cestu začínajúcu sledom reakcií od cholesterolu po produkciu E2 a/alebo T. Skúškou H295R sa nemajú identifikovať chemikálie, ktoré ovplyvňujú steroidogézu v dôsledku účinkov na os HPG (hypotalamus-hypofýza-pohlavné žľazy). Cieľom skúšky nie je poskytnúť odpoveď ÁNO/NIE, pokiaľ ide o potenciál chemikálie indukovať alebo obmedziť produkciu T a E2; v niektorých prípadoch však možno získať kvantitatívne výsledky (pozri odseky 53 a 54). Výsledky skúšky sa vyjadrujú ako relatívne zmeny produkcie hormónov v porovnaní s kontrolami s aplikáciou rozpúšťadla. Cieľom skúšky nie je poskytnúť konkrétne mechanistické informácie týkajúce sa interakcie testovanej chemikálie s endokrinným systémom. Vykonaný bol výskum s použitím bunkovej línie na identifikáciu účinkov na špecifické enzýmy a prostredné hormóny, ako je napríklad progesterón (2).
3. Vymedzenia pojmov a skratky použité v tejto testovacej metóde sú opísané v dodatku. Podrobný protokol vrátane pokynov na prípravu roztokov, kultiváciu buniek a vykonávanie rôznych aspektov testu sú k dispozícii ako dodatok I až III k dokumentu OECD s názvom Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production (4).

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. V biosyntéze pohlavných steroidných hormónov pôsobí päť rôznych enzýmov, ktoré katalyzujú šesť rôznych reakcií. Enzymatická konverzia cholesterolu na pregnenolon enzýmom štiepiacim cholesterolový postranný reťazec (CYP11A) cytochrómu P450 (CYP) predstavuje prvý krok v sérii biochemických reakcií, ktoré kulminujú syntézou steroidných konečných produktov. V závislosti od poradia ďalších dvoch reakcií sa steroidogenetická dráha rozdeľuje na dve dráhy, dráhu Δ^5 -hydroxysteroidu a dráhu Δ^4 -ketosteroidu, ktoré sa spájajú do produkcie androstendiónu (obrázok č. 1).
5. Androstendión sa mení na testosterón (T) dehydrogenáciou 17 β -hydroxysteroidu (17 β -HSD). Testosterón je tak medziprodukt, ako aj konečný hormonálny produkt. T sa u samcov môže meniť na dihydrotestosterón (DHT) 5 α -reduktázou, ktorá sa nachádza v bunkových membránach, obale bunkového jadra a v endoplazmatickom retikule cieľových tkanív androgénnej činnosti, ako sú prostata a semenné mechúriky. DHT je ako androgén podstatne silnejší ako T a považuje sa tiež za konečný hormón. Skúškou H295R sa nemeria DHP (pozri odsek 10).
6. Enzým v steroidogénnej dráhe, ktorý premieňa androgénne chemikálie na estrogénne chemikálie, je aromatáza (CYP19). CYP19 premieňa T na 17 β -estradiol (E2) a androstendión na estrón. E2 a T sa považujú za konečné hormóny steroidogenézy.
7. Špecifickosť činnosti lyázy CYP17 je u jednotlivých druhov pre prostredné substráty rozdielna. U ľudí uprednostňuje tento enzým substráty dráhy Δ^5 -hydroxysteroidu (pregnenolon), zatiaľ čo u potkanov sa uprednostňujú substráty v dráhe Δ^4 -ketosteroidu (progesterón) (19). Týmto rozdielmi činnosti lyázy CYP17 možno vysvetliť rozdielne reakcie jednotlivých druhov na chemikálie, ktoré menia steroidogézu in vivo (6). Ukázalo sa, že bunky H295 najlepšie odrážajú model exprese enzýmu ľudskej dospelej nadobličky a produkcie steroidu (20), ale je známe, že exprimujú enzýmy pre dráhu Δ^5 -hydroxysteroidu a aj pre dráhu Δ^4 -ketosteroidu pre androgénnu syntézu (7) (11) (13) (15).

Obrázok č. 1

Steroidogenéza v bunkách H295R



Poznámka:

Enzýmy sú označené kurzívou, hormóny sú označené tučným písmom a šípky označujú smer syntézy. Šedé pozadie označuje dráhy/produkty kortikosteroidov. Dráhy/produkty pohlavných steroidov sú zakrúžkované. CYP = cytochróm P450; HSD = hydroxysteroid-dehydrogenáza; DHEA = dehydroepiandrosterón.

8. Ľudská bunková línia adenokarcinómu H295R je užitočný in vitro model skúmania účinkov na syntézu steroidných hormónov (2) (7) (8) (9) (10). Bunková línia H295R exprimuje gény, ktoré kódujú pre všetky kľúčové enzýmy pre steroidogézu uvedenú skôr v texte (11) (15) (obrázok č. 1). Je to jedinečná vlastnosť, pretože expresia in vivo týchto génov je špecifická pre jednotlivé tkanivá a vývojové stupne, pričom zvyčajne žiadne tkanivo ani žiadny vývojový stupeň neexprimuje všetky gény zúčastňujúce sa na steroidogéze (2). Bunky H295R majú fyziologické charakteristiky buniek zonálne nediferencovaných ľudských fetálnych nadobličiek (11). Bunky predstavujú jedinečný systém in vitro, keďže majú schopnosť produkovať všetky steroidné hormóny, ktoré sa nachádzajú v kôre dospelých nadobličky a v pohlavných žľazách, čo umožňuje testovanie účinkov na syntézu kortikosteroidov a aj na produkciu pohlavných steroidných hormónov, ako sú androgény a estrogény, hoci skúška je validovaná len na zisťovanie T a E2. Zmeny zaznamenané systémom testovania vo forme zmeny produkcie T a E2 môžu byť výsledkom mnohých rôznych interakcií testovaných chemikálií so steroidogénnymi funkciami, ktoré exprimujú bunky H295R. Medzi ne patrí zmena exprese, syntézy alebo funkcie enzýmov zúčastňujúcich sa na produkcii, premene alebo odstraňovaní steroidných hormónov (12) (13) (14). Inhibícia produkcie hormónov môže byť spôsobená priamou konkurenčnou väzbou na enzým v dráhe, vplyvom na spolufaktory, ako sú NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) a cAMP (cyklický adenosínmonofosfát), a/alebo zvýšením steroidného metabolizmu alebo potlačením génovej exprese určitých enzýmov v steroidogéze. Zatiaľ čo inhibícia môže byť funkciou priamych alebo nepriamych procesov súvisiacich s produkciou hormónov, indukcia je zvyčajne nepriama, napríklad tým, že ovplyvňuje spolufaktory, ako sú NADPH a cAMP (ako v prípade forskolínu), znižuje steroidný metabolizmus (13) alebo zvyšuje steroidogénovú expresiu génov.

9. Skúška H295R má viaceré výhody:

— umožňuje určiť zvýšenie a zníženie produkcie T a E2;

— umožňuje priame posúdenie možného vplyvu chemikálie na životaschopnosť/cytotoxicitu buniek. Je to dôležitý prvok, keďže umožňuje rozlišovať účinky spôsobené cytotoxicitou od účinkov spôsobených priamou interakciou chemikálií so steroidogézou, čo nie je možné v systémoch tkanivových explantátov, ktoré pozostávajú z rozmanitých typov buniek rôznej citlivosti a rôznych funkcií;

- nevyžaduje si použitie zvierat;
- bunková línia H295R je komerčne dostupná.

10. Zásadné obmedzenia skúšky sú tieto:

- jej metabolická schopnosť je neznáma, pravdepodobne je však pomerne obmedzená; preto sa v tejto skúške pravdepodobne prehliadnu chemikálie, ktoré sa musia metabolicky aktivovať;
- keďže H295R sa získava z tkaniva nadobličiek, obsahuje enzýmy schopné produkovať glukokortikoidy a mineralokortikoidy, ako aj pohlavné hormóny, preto by účinky na produkciu glukokortikoidov a mineralokortikoidov mohli ovplyvniť úrovne T a E2 pozorované v skúške;
- nemeria DHT, a preto zrejme nezistí chemikálie, ktoré potláčajú 5 α -reduktázu, v takomto prípade sa môže použiť Hershbergerov test(16);
- skúškou H295R sa nezistia chemikálie, ktoré narúšajú steroidogézu ovplyvnením HPG osi (hypotalamus-hypofýza-pohlavné žľazy), keďže to možno skúmať len v prípade neporušených zvierat.

PRINCÍP TESTU

11. Cieľom skúšky je zistiť chemikálie, ktoré ovplyvňujú produkciu T a E2. T je tiež medzistupeň v produkcii E2. Skúškou možno zistiť chemikálie, ktoré typicky potláčajú alebo indukujú enzýmy steroidogézy.
12. Skúška sa zvyčajne vykonáva v štandardných podmienkach kultivácie buniek na 24-jamkových platničkách pre bunkové kultúry. Prípadne možno na vykonanie skúšky použiť platničky iných veľkostí; nasadenie a podmienky skúšky by sa však mali vhodne upraviť tak, aby boli dodržané kritériá vykonávania.
13. Po aklimatizačnom období 24 hodín na viacjamkových platničkách sa bunky po dobu 48 hodín vystavia siedmim koncentráciám testovaných chemikálií, a to minimálne trojmo. Rozpúšťadlo, známy inhibítor a spúšťač produkcie hormónov sa testujú v pevnej koncentrácii ako negatívne a pozitívne kontrolné vzorky. Na konci doby expozície sa z každej jamky odstráni médium. Životaschopnosť buniek v každej bunke sa analyzuje hneď po odstránení média. Koncentrácie hormónov v médiu možno merať pomocou rôznych metód, a to aj pomocou komerčne dostupných súprav na meranie hormónov a/alebo inštrumentálnych metód, ako je napríklad metóda kvapalinovej kromatografie – hmotnostnej spektrometrie (LC-MS). Údaje sa vyjadrujú ako násobná zmena v porovnaní s kontrolou rozpúšťadla a najnižšou koncentráciou s pozorovaným účinkom (LOEC). Keď je skúška negatívna, najvyššia testovaná koncentrácia sa uvedie ako koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC). Závbery týkajúce sa schopnosti chemikálie ovplyvniť steroidogézu by mali byť založené najmenej na dvoch nezávislých pokusoch. Prvý pokus môže fungovať ako pokus na zistenie rozsahu, v druhom a prípadne treťom pokuse sa rozsahy následne upravujú, ak sa vyskytnú problémy s rozpustnosťou alebo cytotoxicitou alebo ak sa zdá, že chemikália je na konci rozsahu testovaných koncentrácií.

PRÍPRAVA KULTÚR

Bunková línia

14. Bunky NCI-H295R sú komerčne dostupné z kolekcie kultúr amerického typu (ATCC) po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA) ⁽¹⁾.

Úvod

15. Z dôvodu zmien schopnosti buniek produkovať E2 s narastajúcim vekom/zvyšujúcimi sa pasážami (2) by sa bunky pred použitím mali kultivovať na základe osobitného protokolu a počtu pasáží, keďže bunky boli rozmrazené, a mal by sa poznamenať aj počet pasáží, pri ktorom boli bunky zamrazené a umiestnené v tekutom dusíku na uskladnenie. Prvým číslom sa označuje aktuálne číslo pasáže bunky a druhým číslom sa opisuje počet pasáží, pri ktorom sa bunky zamrazili a uskladnili. Napríklad bunky, ktoré sa zamrazili po piatej pasáži a rozmrazili, a potom sa trikrát delili (4 pasáže, pričom čerstvo rozmrazené bunky sa počítajú ako pasáž 1), by sa po opätovnej kultivácii označili ako pasáž 4.5. Príklad systému číslovania je znázornený v dodatku č. I k validačnej správe (4).
16. Zásobné médium sa používa ako základ pre obohatené a mraziace médium. Obohatené médium je potrebné na kultiváciu buniek. Mraziace médium je osobitne určené na umožnenie mrazenia buniek na dlhodobé skladovanie

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

bez akýchkoľvek účinkov. Pred použitím by sa malo NuSerum (alebo porovnateľné sérum s rovnakými vlastnosťami, u ktorého sa preukázalo, že produkuje údaje v súlade s požiadavkami na efektívnosť testu a kontrolu kvality), ktoré je zložkou obohateného média, analyzovať na koncentrácie T a E2 v pozadí. Príprava týchto roztokov sa popisuje v dodatku č. II k validačnej správe (4).

17. Po aktivácii bunkovej kultúry H295R z pôvodnej série ATCC by sa bunky mali namnožiť pre päť pasáží (t. j. bunky sa delia štyrikrát). Bunky z piatej pasáže sa potom zmrazia v tekutom dusíku na uskladnenie. Pred zmrazením buniek sa vzorka buniek z predchádzajúcej štvrtej pasáže otestuje na platničke na kontrolu kvality (pozri odseky 36 a 37) na overenie, či základná produkcia hormónov a reakcia na pozitívne kontrolné chemikálie spĺňajú kritériá kontroly kvality skúšky vymedzené v tabuľke 5.
18. Bunky H295R sa musia kultivovať, mraziť a uskladňovať v tekutom dusíku, aby boli k dispozícii bunky vhodnej pasáže/veku na kultiváciu a použitie. Maximálny počet pasáží po prevzatí novej ⁽¹⁾ alebo zmrazenej ⁽²⁾ série buniek na kultiváciu, ktorý je prijateľný na použitie v skúške H295R, by mal byť najviac 10. Napríklad prijateľné pasáže pre kultúry buniek zo série zmrazenej v pasáži 5 by boli od 4.5 do 10.5. V prípade buniek aktivovaných z týchto zmrazených sérií sa dodržiava postup popísaný v odseku 19. Tieto bunky by sa pred svojím použitím v testovaní mali kultivovať najmenej štyri (4) ďalšie pasáže (pasáž 4.5).

Štartovacie bunky zo zmrazených zásob

19. Postup na aktiváciu buniek zo zmrazených zásob sa použije, keď sa na účely kultivácie a testovania vyberie nová séria buniek zo zásob uskladnených v tekutom dusíku. Podrobné informácie pre tento postup sa uvádzajú v dodatku č. III k validačnej správe (4). Bunky sa vyberú z tekutého dusíka, rýchlo sa rozmrazia, vložia sa v obohatenom médiu do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri izbovej teplote, resuspendujú sa v obohatenom médiu a prenesú sa do kultivačnej banky. Médium by sa malo ďalší deň vymeniť. Bunky H295R sa kultivujú v inkubátore pri 37 °C vo vzdušnej atmosfére s 5 %CO₂ a médium sa mení za nové dva- až trikrát za týždeň. Keď sú bunky konfluentné na približne 85 až 90 %, mali by sa deliť. Delenie buniek je potrebné na zabezpečenie zdravia a rastu buniek a na zachovanie buniek na vykonávanie biologických testov. Bunky sa trikrát opláchnu s fosfátovo tlmivým fyziologickým roztokom (PBS bez Ca²⁺ Mg²⁺) a uvoľnia sa z kultivačnej banky pridaním vhodného oddeľujúceho enzýmu, napr. trypsínu, do fosfátovo tlmivého roztoku (bez Ca²⁺ Mg²⁺). Ihneď po oddelení buniek od kultivačnej banky by sa enzymatická reakcia mala zastaviť pridaním obohateného média v trojnásobnom pomere k objemu použitému na enzymatickú úpravu. Bunky sa vložia do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri izbovej teplote, odstráni sa supernatant a peleta buniek sa resuspenduje v obohatenom médiu. Vhodné množstvo bunkového roztoku sa umiestni do novej kultivačnej banky. Množstvo bunkového roztoku by sa malo upraviť tak, aby boli bunky konfluentné do 5 až 7 dní. Odporúčaný subkultivačný pomer je 1:3 až 1:4. Platnička by sa mala starostlivo označiť. Bunky sú teraz pripravené na použitie v skúške a nadbytočné bunky by sa mali zmraziť v tekutom dusíku, ako sa opisuje v odseku 20.

Mrazenie buniek H295R (príprava buniek na uskladnenie v tekutom dusíku)

20. Pri príprave buniek H295R na zmrazenie sa dodržiava postup popísaný vyššie v súvislosti s delením buniek až po krok resuspendácie pelety buniek na dne odstredivkovej skúmavky. Tu sa peleta buniek resuspenduje v mraziacom médiu. Roztok sa prenesie do kryogenickej nádoby, príslušne sa označí a mrazí sa pri – 80 °C po dobu 24 hodín, potom sa kryogenická nádoba prenesie do tekutého dusíku na uskladnenie. Podrobné informácie o tomto postupe sa uvádzajú v dodatku č. III k validačnej správe (4).

Platničky a predinkubácia buniek na testovanie

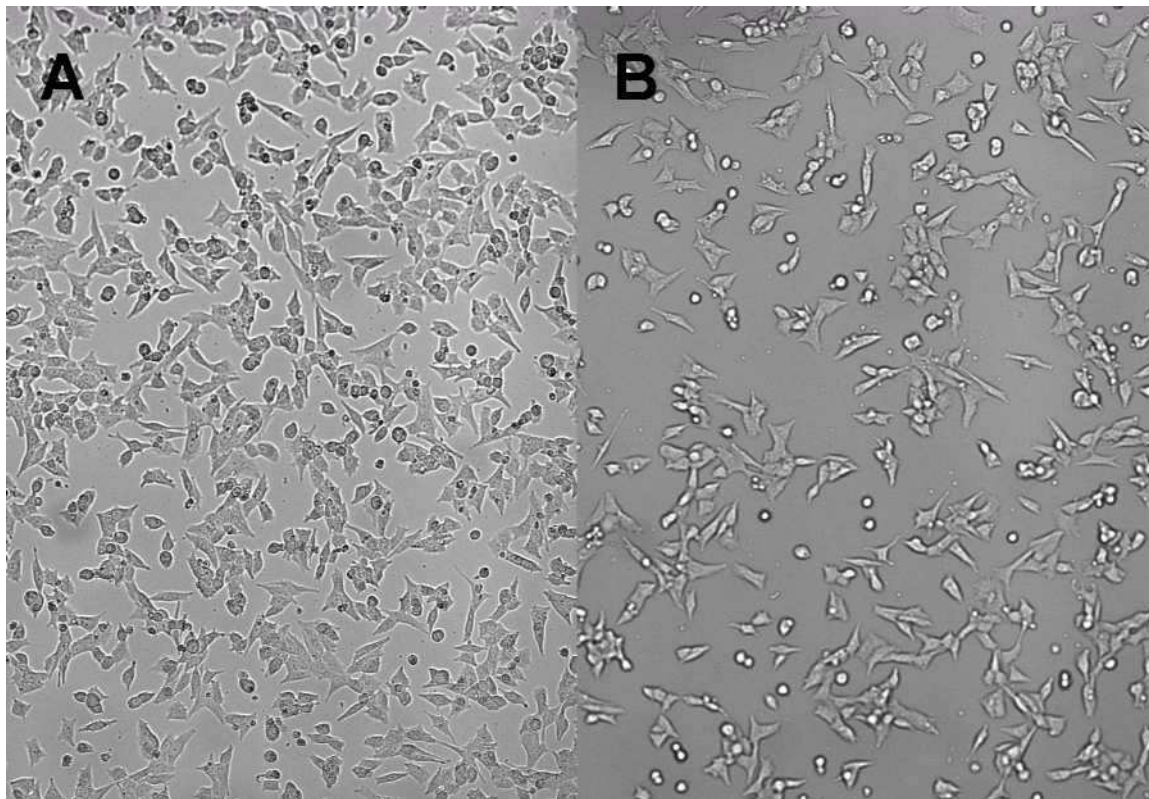
21. Potrebný počet 24-jamkových platničiek pripravených podľa opisu v odseku 19 závisí od počtu testovaných chemikálií a konfluencie buniek v kultivačných miskách. Spravidla jedna kultivačná banka (75 cm²) s bunkami konfluentnými na 80 až 90 % poskytne dostatok buniek pre jednu až 1,5 (24-jamkovú) platničku v cieľovej hustote 200 000 až 300 000 buniek na ml média, z čoho vyplýva približne 50 až 60 % konfluencia v jamkách po 24 hodinách (obrázok č. 2). To je typicky optimálna hustota buniek na produkciu hormónov v skúške. Pri vyšších hustotách sa mení charakteristika produkcie T a aj E2. Pred prvým vykonaním skúšky sa odporúča testovanie rôznych hustôt nasadenia od 200 000 do 300 000 buniek na ml a hustota, ktorá povedie k 50 – 60 % konfluencii v jamke po 24 hodinách, sa vyberie pre ďalšie skúšky.

⁽¹⁾ „Nová séria“ označuje čerstvú sériu buniek z ATCC.

⁽²⁾ „Zmrazená séria“ označuje bunky, ktoré boli predtým kultivované a zmrazené v laboratóriu inom než ATCC.

Obrázok č. 2

Fotomikrograf buniek H295R pri hustote nasadenia 50 % na 24-jamkovej kultivačnej platničke po 24 hodinách vyhotovený na kraji (A) a v strede (B) jamky



22. Médium sa pipetou odoberie z kultivačnej banky a bunky sa trikrát prepláchnu sterilným fosfátovo tlmivým fyziologickým roztokom (bez $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$). Na oddelenie buniek od kultivačnej banky sa pridá enzymatický roztok (vo fosfátovo tlmivom fyziologickom roztoku). Po vhodnom čase na oddelenie buniek by sa enzymatická reakcia mala zastaviť pridaním obohateného média v trojnásobnom pomere k objemu použitému na enzymatickú úpravu. Bunky sa vložia do odstredivkovej skúmavky, odstredia sa pri izbovej teplote, odstráni sa supernatant a peleta buniek sa resuspenduje v obohatenom médiu. Hustota buniek sa vypočíta s použitím napr. hemocytometra alebo počítadla buniek. Bunkový roztok by sa mal rozriediť na želanú očkovaciu hustotu a poriadne premiešať na zaistenie homogénnej hustoty buniek. Bunky by sa mali na platničky vkladať s 1 ml bunkového roztoku na jamku a platničky a misky sa označia. Nasadené platničky sa inkubujú pri 37 °C vo vzdušnej atmosfére s obsahom menej ako 5 % CO_2 po dobu 24 hodín, aby sa bunky mohli prichytiť k jamkám.

POŽIADAVKY NA KONTROLU KVALITY

23. Je dôležité, aby sa do jamiek počas dávkovania dali presné množstvá roztokov a vzoriek, pretože tieto objemy určujú koncentrácie použité pri výpočte výsledkov skúšky.
24. Pred začatím kultivácie buniek a následným testovaním by každé laboratórium malo preukázať citlivosť svojho systému merania hormónov (odseky 29 až 31).
25. Keď sa majú použiť skúšky na meranie hormónov založené na protilátkach, testované chemikálie by sa pred začatím testovania mali analyzovať na potenciál narušiť systém merania použitý na kvantifikáciu T a E2, ako sa popisuje v odseku 32.

26. DMSO je odporúčané rozpúšťadlo pre skúšku. Ak sa použije iné rozpúšťadlo, mali by sa určiť tieto faktory:

- rozpustnosť testovanej chemikálie, forskolínu a prochlorazu v rozpúšťadle; a
- cytotoxicita ako funkcia koncentrácie rozpúšťadla.

Odporúča sa, aby maximálna prípustná koncentrácia rozpúšťadla nepresiahla 10-násobné rozriedenie najmenej cytotoxickej koncentrácie rozpúšťadla.

27. Pred prvým testovaním by laboratórium malo vykonať kvalifikačný pokus na preukázanie, že laboratórium je schopné udržať a dosiahnuť vhodnú bunkovú kultúru a podmienky skúšky potrebné na testovanie chemikálií, ako sa popisuje v odsekoch 33 až 35.
28. Pri začatí testovania novej série buniek by sa pred použitím novej série buniek najprv mala otestovať kontrolná platnička, aby sa posúdilo správanie buniek, ako sa popisuje v odsekoch 36 a 37.

Systém merania hormónov

Citlivosť metódy, správnosť, presnosť a krížová reaktivita so vzorovou maticou

29. Každé laboratórium môže na analýzu produkcie T a E2 bunkami H295R používať systém merania hormónov podľa vlastného výberu, pokiaľ spĺňa kritériá vykonávania vrátane limitu kvantifikácie. Nominálne to sú 100 pg/ml pre T a 10 pg/ml pre E2 založené na základných hormonálnych úrovniach pozorovaných vo validačných štúdiách. Môžu však byť vhodné aj väčšie alebo nižšie úrovne v závislosti od základných hormonálnych úrovní dosiahnutých vo vykonávajúcom laboratóriu. Kým laboratórium začne testy na platničkách na kontrolu kvality a skúšobné pokusy, malo by preukázať, že skúškou hormónov, ktorá sa má použiť, sa môžu merať koncentrácie hormónov v obohatenom médiu so správnosťou a presnosťou dostatočnými na dodržanie kritérií kvality kontroly stanovených v tabuľkách 1 a 5 analyzovaním obohateného média s vnútornou kontrolou hormónov. Do obohateného média by sa mali pridať najmenej tri koncentrácie z každého hormónu (napr. 100, 500 a 2 500 pg/ml T; 10, 50 a 250 pg/ml E2; alebo sa pre najnižšie obohacovacie koncentrácie T a E2 môžu použiť najnižšie možné koncentrácie založené na detekčných limitoch zvoleného systému merania hormónov) a potom sa analyzujú. Namerané koncentrácie hormónov v neextrahovaných vzorkách by mali byť do 30 % nominálnych koncentrácií a variabilita opakovaných meraní rovnakej vzorky by nemala presiahnuť 25 % (pozri aj tabuľku 8, v ktorej sa uvádzajú ďalšie kritériá kontroly kvality). Ak sú splnené tieto kritériá kontroly kvality, predpokladá sa, že zvolená skúška merania hormónov je dostatočne správna, presná a nemá krížovú reakciu so zložkami v médiu (vzorová matica) tak, žeby sa očakávalo významne ovplyvnenie výsledku skúšky. V takomto prípade sa nevyžaduje extrakcia vzoriek pred meraním hormónov.
30. V prípade, že kritériá kontroly kvality v tabuľkách 1 a 8 nie sú splnené, môže nastať významný maticový účinok, a mala by sa vykonať skúška s extrahovaným doplneným médiom. Príklad postupu extrakcie je popísaný v dodatku č. II k validačnej správe (4). Koncentrácie hormónov v extrahovaných vzorkách by sa mali merať trojmo. ⁽¹⁾ Ak sa dá dokázať, že zložky média po extrakcii nenarúšajú metódu zisťovania hormónov v zmysle vymedzení kritérií kontroly kvality, všetky ďalšie skúšky by sa mali vykonať s použitím extrahovaných vzoriek. Ak po extrakcii nie je možné splniť kritériá kontroly kvality, použitý systém merania hormónov nie je vhodný na účely skúšky steroidogenézy H295R a mala by sa použiť iná metóda zisťovania hormónov.

Štandardná krivka

31. Koncentrácie hormónov kontrolných vzoriek s aplikáciou rozpúšťadla by sa mali pohybovať v lineárnej časti štandardnej krivky. Hodnoty kontrol s aplikáciou rozpúšťadla by sa podľa možnosti mali nachádzať v strede lineárnej časti, aby bolo možné merať indukciu a inhibíciu syntézy hormónov. Primerane sa zvolia riedenia média (alebo extrakty), ktoré sa majú merať. Lineárny vzťah sa určí vhodným štatistickým postupom.

Test interferencie chemikálií

32. Ak sa majú na meranie hormónov použiť skúšky založené na protilátkach, ako napríklad enzýmatická imunosorbentná analýza ELISA a rádioimunologické skúšky (RIA), každá chemikália by sa pred začatím skutočného testovania chemikálií mala otestovať na možnú interferenciu so systémom merania hormónov [dodatok č. III k validačnej správe (4)], pretože niektoré chemikálie môžu narúšať tieto testy (17). Ak nastane interferencia, ktorá je ≥ 20 % základnej hormonálnej produkcie pre T a/alebo E2 podľa stanovenia analýzou hormónov, mal by sa vykonať test interferencie pri skúške pôsobenia chemikálií na hormóny [ako sa popisuje v dodatku č. III

⁽¹⁾ Poznámka: Ak sa požaduje extrakcia, vykonajú sa tri opakované merania pre každý extrakt. Každá vzorka sa extrahuje len raz.

k validačnej správe (4) oddiel 5.0] vo všetkých riedeniach zásobných roztokov testovaných chemikálií na určenie prahovej dávky, pri ktorej nastane interferencia (≥ 20 %). Ak je interferencia menšia ako 30 %, výsledky možno upraviť o interferenciu. Ak interferencia presahuje 30 %, údaje sú neplatné a údaje z týchto koncentrácií by sa mali vyradiť. Ak nastane významná interferencia testovanej chemikálie so systémom merania hormónov pri viac ako jednej necytotoxickej koncentrácii, mal by sa použiť iný systém merania hormónov. V záujme zamedzenia interferencie kontaminujúcich chemikálií sa odporúča, aby sa hormóny extrahovali z média s použitím vhodného rozpúšťadla, možné metódy možno nájsť vo validačnej správe (4).

Tabuľka 1

Kritériá pre systémy merania hormónov

Parameter	Kritérium
Citlivosť metódy merania	Limit kvantifikácie (LOQ – Limit of quantification) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Účinnosť extrakcie hormónov (len v prípade potreby extrakcie)	Priemerné miery výťažnosti (na základe trojitých meraní) v prípade doplnených množstiev hormónov by sa nemali od dodaného množstva odchyľovať o viac než 30 %.
Interferencia chemikálie (len v prípade systémov založených na protilátkach)	Nemala by nastať žiadna významná (≥ 30 % základnej produkcie príslušného hormónu) krížová reakcia so žiadnym hormónom produkovaným bunkami ^(b) ^(c)

^(a) Poznámka: Limity metódy merania vychádzajú z hodnôt základnej produkcie hormónov uvedených v tabuľke 5 a sú založené na výsledkoch. Ak je možné dosiahnuť vyššiu základnú produkciu hormónov, limit môže byť väčší.

^(b) Niektoré protilátky T a E2 môžu mať pri vyšších percentuálnych podieloch krížovú reakciu s androstendiónom a estrónom. V takýchto prípadoch nie je možné správne určiť účinky na 17 β -HSD. Údaje však môžu aj tak poskytnúť užitočné informácie o účinkoch na všeobecnú produkciu estrogénu alebo androgénu. V takýchto prípadoch by sa údaje mali vyjadriť ako reakcie androgénu/estrogénu a nie E2 a T.

^(c) Tieto zahŕňajú: cholesterol, pregnenolón, progesterón, 11-deoxykortikosterón, kortikosterón, aldosterón, 17 α -pregnenolón, 17 α -progesterón, deoxykortizol, kortizol, DHEA, androstendión, estrón.

Skúška spôsobilosti laboratória

33. Laboratórium by malo pred testovaním neznámych chemikálií preukázať, že je spôsobilé dosiahnuť a udržať vhodné bunkové kultúry a testovacie podmienky potrebné na úspešné vykonanie skúšky, a to vykonaním skúšky spôsobilosti laboratória. Keďže vykonanie skúšky je priamo spojené s personálom laboratória, ktorý vykonáva skúšku, tieto postupy by sa mali čiastočne opakovať pri zmene personálu laboratória.
34. Táto skúška spôsobilosti sa vykoná za rovnakých podmienok uvedených v odsekoch 38 až 40 expozíciou buniek 7 zvyšujúcim sa koncentraciám silných, stredných a slabých induktorov a inhibítorov a aj negatívnym chemikáliám (pozri tabuľku 2). Medzi chemikálie, ktoré sa majú testovať, patria najmä silný induktor forskolín (č. CAS 66575-29-9); silný inhibítor prochloraz (č. CAS 67747-09-5); stredný induktor atrazín (č. CAS 1912-24-9); stredný inhibítor aminoglutetimid (č. CAS 125-84-8); slabý induktor (produkcia E2) a slabý inhibítor (produkcia T) bisfenol A (č. CAS 80-05-7); a negatívna chemikália ľudský choriový gonadotropín (HCG) (č. CAS 9002-61-3), ako sa uvádza v tabuľke 2. Pre všetky chemikálie sa použijú osobitné platničky a použije sa formát uvedený v tabuľke 6. Pri každom dennom testovaní chemikálií by sa mala na preukázanie spôsobilosti testovať aj jedna platnička na kontrolu kvality (tabuľka 4, odseky 36 a 37).

Tabuľka 2

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti a expozičné koncentrácie

Chemikália na preukázanie spôsobilosti	Testovacie koncentrácie [μ M]
Prochloraz	0 ^(a) ; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolín	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Chemikálie na preukázanie spôsobilosti	Testovacie koncentrácie [μ M]
Atrazín	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutetimid	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 (0) s aplikáciou rozpúšťadla (DMSO), 1 μ l DMSO/jamka

Vystavenie H295R pôsobeniu chemikálií na preukázanie spôsobilosti by sa počas skúšky spôsobilosti laboratória malo vykonávať na 24-jamkových platničkách. Dávkovanie je v prípade všetkých dávok testovaných chemikálií v μ M. Dávky by sa mali podávať v DMSO pri 0,1 % v/v na jamku. Všetky testovacie koncentrácie by sa mali testovať v troch jamkách (tabuľka 6). Pre každú chemikáliu sa použijú osobitné platničky. Pri každom dennom testovaní by sa mala použiť aj jedna platnička na kontrolu kvality.

35. Životnosť buniek a hormóny by sa mali analyzovať podľa odsekov 42 až 46. Prahová hodnota (najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom, LOEC) a rozhodnutie o klasifikácii by sa mali vykazovať a porovnávať podľa hodnôt uvedených v tabuľke 3. Údaje sa považujú za prijateľné, keď spĺňajú LOEC a rozhodnutie o klasifikácii uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Prahové hodnoty (LOEC) a rozhodnutie o klasifikácii pre chemikálie na preukázanie spôsobilosti

	č. CAS	LOEC [μ M]		Rozhodnutie o klasifikácii	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ (^a) (inhibícia)	+ (inhibícia)
Forskolín	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (indukcia)	+ (indukcia)
Atrazín	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcia)	+ (indukcia)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibícia)	+ (inhibícia)
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibícia)	+ (indukcia)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	negatívne	negatívne

(^a) +, pozitívne

n/a: neuplatňuje sa, keďže sa nevyskytli žiadne zmeny po vystavení pôsobeniu necytotoxických koncentrácií negatívnej kontrolnej vzorky.

Platnička na kontrolu kvality

36. Platnička na kontrolu kvality sa používa na overenie správania sa buniek H295R v štandardných kultivačných podmienkach a na zriadenie historickej databázy pre koncentrácie hormónov v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla, v pozitívnych a negatívnych kontrolných vzorkách, ako aj v iných meraniach na kontrolu kvality v priebehu času.
- Správanie buniek H295R by sa malo posudzovať s použitím platničky na kontrolu kvality pre každú novú sériu ATCC alebo pri prvom použití predtým zmrazených zásob buniek, pokiaľ sa s touto sériou buniek nevykonala skúška spôsobilosti laboratória (odseky 32 až 34).
 - Platnička na kontrolu kvality poskytuje úplné posúdenie podmienok skúšky (napr. životaschopnosť buniek, kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, negatívne a pozitívne kontrolné vzorky, ako aj variabilita v rámci skúšky a medzi skúškami) pri testovaní chemikálií a mala by byť súčasťou každého testovania.
37. Testovanie na kontrolu kvality sa vykonáva na 24-jamkovej platničke s rovnakou inkubáciou, dávkovaním, životaschopnosťou/cytotoxicitou buniek, postupmi extrakcie hormónov a analýzy hormónov, ako sú popísané v odsekoch 38 až 46 na testovanie chemikálií. Platnička na kontrolu kvality obsahuje slepé vzorky, kontroly s aplikáciou

rozpúšťadla a dve koncentrácie známeho induktora (forskolín 1, 10 μM) a inhibítora (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntézy E2 a T. Okrem toho sa vo vybraných jamkách používa MeOH ako pozitívna kontrolná vzorka na skúšku životaschopnosti/cytotoxicity. Podrobný popis rozvrhnutia platničky sa uvádza v tabuľke 4. Kritériá, ktoré sa majú splniť na platničke na kontrolu kvality, sa uvádzajú v tabuľke 5. Minimálna základná produkcia hormónov pre T a E2 by mala byť dodržaná v jamkách na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a aj v jamkách so slepou vzorkou.

Tabuľka 4

Rozvrhnutie platničky na kontrolu kvality na vykonanie testovania nevystavených buniek H295R a buniek vystavených známym inhibítorm (PRO = prochloraz) a stimulátorom (FOR = forskolín) produkcie E2 a T. Po ukončení skúšky expozície a odstránení média sa do všetkých jamiek MeOH pridá 70 % roztok metanolu, čo bude slúžiť ako pozitívna kontrolná vzorka cytotoxicity [pozri skúšku cytotoxicity v dodatku č. III k validačnej správe (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	slepá vzorka ^(a)	slepá vzorka ^(a)	slepá vzorka ^(a)	slepá vzorka ^(a) (+ MeOH) ^(b)	slepá vzorka ^(a) (+ MeOH) ^(b)	slepá vzorka ^(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) Bunky v jamkách so slepou vzorkou dostanú len médium (t. j. žiadne rozpúšťadlo).

^(b) Metanol (MeOH) sa pridá po ukončení expozície a odstránení média z týchto buniek.

^(c) Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla DMSO (1 μl /jamka).

Tabuľka 5

Kritériá pre platničku na kontrolu kvality

	T	E2
Základná produkcia hormónov pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla (SC)	≥ 5 -krát limit kvantifikácie (LOQ)	$\geq 2,5$ -krát LOQ
Indukcia (10 μM forskolín)	$\geq 1,5$ -krát SC	$\geq 7,5$ -krát SC
Inhibícia (1 μM prochloraz)	$\geq 0,5$ -krát SC	$\geq 0,5$ -krát SC

POSTUP EXPOZÍCIE CHEMIKÁLIÍ

38. Predinkubované bunky sa vyberú z inkubátora (odsek 21) a pred dávkovaním sa skontrolujú pod mikroskopom, či sú v dobrom stave (uchytenie, morfológia).
39. Bunky sa umiestnia do biologicky bezpečnej nádoby a obohatené médium sa odstráni a nahradí sa novým obohateným médiom (1 ml/jamka). Uprednostňovaným rozpúšťadlom pre túto testovaciu metódu je DMSO. Ak však existujú dôvody na použitie iných rozpúšťadiel, malo by sa popísať vedecké zdôvodnenie. Bunky sa vystavia testovanej chemikálii pridaním 1 μl vhodného zásobného roztoku do DMSO [pozri dodatok č. II k validačnej správe (4)] na 1 ml obohateného média (objem jamky). To povedie ku konečnej koncentrácii 0,1 % DMSO v jamkách.

Na zabezpečenie dostatočného pomiešania sa všeobecne odporúča, aby sa vhodný zásobný roztok testovanej chemikálie v DMOS zmiešal na získanie želanej konečnej koncentrácie pre každú dávku s obohateným médiom a aby sa zmes pridala do každej jamky ihneď po odstránení starého média. Keď sa použije táto možnosť, koncentrácia DMSO (0,1 %) by mala byť vo všetkých jamkách konzistentná. Jamky obsahujúce dve najväčšie koncentrácie sa vizuálne s použitím stereomikroskopu posúdia na tvorbu zrazenín alebo zakalenia, čo by poukazovalo na neúplnú rozpustnosť testovanej chemikálie. Keď sa spozorujú takéto podmienky (zakalenosť, tvorba zrazenín), preskúmajú sa jamky obsahujúce dve nasledujúce menšie koncentrácie (a tak ďalej), a koncentrácie, ktoré sa úplne nerozpustili, sa vylúčia z ďalšieho hodnotenia a analýzy. Platnička sa na 48 hodín opäť vloží do inkubátora pri teplote 37 °C vo vzdušnej atmosfére s obsahom menej ako 5 % CO₂. Rozloženie platničky s testovanou chemikáliou sa uvádza v tabuľke 6. Zásoby 1 až 7 vykazujú umiestnenie zvyšujúcich sa dávok testovanej chemikálie.

Tabuľka 6

Schéma dávkovania na vystavenie buniek H295R pôsobeniu testovaných chemikálií na 24-jamkovej platničke

	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. Expozičné platničky sa po 48 hodinách vyberú z inkubátora a každá jamka sa pod mikroskopom skontroluje na stav buniek (uchytenie, morfológia, stupeň konfluencie) a náznaky cytotoxicity. Médium sa z každej jamky rozdelí na dve rovnaké množstvá (každá časť približne 490 µl) a prenesie sa do dvoch samostatných nádobiek, ktoré sa príslušne označia (t. j. jedna alikvotná časť na zabezpečenie náhradnej vzorky pre každú jamku). Aby bunky nevyschli, médium sa odstraňuje a nahrádza médiom na skúšku životaschopnosti/cytotoxicity buniek podľa jednotlivých radov alebo stĺpcov. Keď sa životaschopnosť/cytotoxicita buniek nemeria ihneď, do každej bunky sa pridá 200 µl fosfátovo tlmivého roztoku s Ca²⁺ a Mg²⁺. Média sa do ďalšieho spracovania na analýzu koncentrácií hormónov zmrazia pri teplote – 80 °C (pozri odseky 44 až 46). T a E2 v médiu udržiavanom v teplote – 80 °C sú všeobecne síce stabilné najmenej po dobu 3 mesiacov, v každom laboratóriu by sa však mala dokumentovať stabilita hormónov počas skladovania.
41. Ihneď po odstránení média sa určuje životaschopnosť/cytotoxicita buniek pre každú expozičnú platničku.

Určovanie životaschopnosti buniek

42. Zvolená skúška životaschopnosti/cytotoxicity buniek sa môže použiť na určenie potenciálneho vplyvu testovanej chemikálie na životaschopnosť buniek. Skúška by mala byť schopná poskytnúť pravdivú mieru percentuálneho podielu životaschopných buniek v jamke alebo by mala preukázať, že je priamo porovnateľná (lineárna funkcia) so skúškou Live/Dead® [pozri dodatok č. III k validačnej správe (4)]. Iná skúška, ktorá preukázateľne funguje rovnako dobre, je test MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyln tetrazolium bromid] (18). Posúdenie životaschopnosti buniek s použitím uvedených metód je relatívne meranie, ktoré nemusí preukázať lineárne vzťahy s absolútnym počtom buniek v jamke. Preto by analytik mal vizuálne subjektívne, paralelne posúdiť každú jamku a mali by sa digitálne odфотографovať kontroly s aplikáciou rozpúšťadla a dve najväčšie necytotoxické koncentrácie, ktoré sa zaarchivujú na neskoršie posúdenie skutočnej hustoty buniek, ak by to bolo potrebné. Ak by z vizuálneho preskúmania alebo zo skúšky životaschopnosti/cytotoxicity vyplynulo zdanlivé zvýšenie počtu buniek, musí sa toto zvýšenie overiť. Keď sa zvýšenie buniek overí, malo by sa to uviesť v protokole z testu. Životaschopnosť buniek sa vyjadruje pomerne k priemernej reakcii v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla, ktorá sa považuje za 100 % životaschopných buniek, a vypočítava sa nálezite pre použitú skúšku životaschopnosti/cytotoxicity buniek. V prípade skúšky MTT sa môže použiť tento vzorec:

% životaschopných buniek = [reakcia v jamke – priemerná reakcia v jamkách s MeOH (= 100 % mŕtvych)] ÷ [priemerná reakcia v jamkách SC – priemerná reakcia v jamkách s MeOH (= 100 % mŕtvych)]

43. Jamky so životaschopnosťou nižšou ako 80 % v pomere k priemernej životaschopnosti v kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (= 100 % životaschopnosť) by sa nemali zahrnúť do konečnej analýzy údajov. Inhibícia steroidogénny vyvíjajúcej sa v prítomnosti takmer 20 % cytotoxicity by sa mala hodnotiť opatrne, aby sa zabezpečilo, že príčinou inhibície nie je cytotoxicita.

Analýza hormónov

44. Každé laboratórium môže na analýzu T a E2 použiť systém merania hormónov podľa vlastného výberu. Náhradné alikvotné časti média z každej pokusnej skupiny sa môžu použiť na prípravu roztokov tak, aby sa koncentrácia dostala do lineárnej časti štandardnej krivky. Ako sa uvádza v odseku 29, každé laboratórium by malo pred vykonaním kontroly kvality alebo testovania chemikálií preukázať súlad svojho systému merania hormónov (napr. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kritériami kontroly kvality analýzou obohateného média s pridanou vnútornou kontrolnou vzorkou hormónov. Aby zložky testovacieho systému nenarušali meranie hormónov, hormóny bude možno potrebné pred ich meraním extrahovať z média (pozri odsek 30, v ktorom sa uvádzajú podmienky, za ktorých sa extrakcia vyžaduje alebo nevyžaduje). Odporúča sa vykonať extrakciu podľa postupov uvedených v dodatku č. III k validačnej správe (4).
45. Ak sa na meranie produkcie hormónov používa komerčná testovacia súprava, analýza hormónov by sa mala vykonať podľa popisu v príručkách výrobcu testovacej súpravy. Väčšina výrobcov má špecifický postup, akým sa vykonávajú analýzy hormónov. Riedenia vzoriek sa upravujú tak, aby sa očakávané koncentrácie hormónov kontrol s aplikáciou rozpúšťadla pohybovali v strede lineárnej časti štandardnej krivky individuálnej skúšky [dodatok č. III k validačnej správe (4)]. Hodnoty mimo lineárnej časti štandardnej krivky sa zavrhnú.
46. Konečné koncentrácie hormónov sa vypočítavajú takto:

Príklad:

Extrahované:	450 µl média
Rekonstituované v:	250 µl tlmivého roztoku
Testovacie riedenie:	1:10 (aby bola vzorka v lineárnej časti štandardnej krivky)
Testovacia koncentrácia hormónov:	150 pg/ml (už upravená na koncentráciu na ml testovanej vzorky)
Výťažnosť:	89 %
Konečná koncentrácia hormónov =	[Koncentrácia hormónov (na ml) ÷ výťažnosť] (faktor riedenia)
Konečná koncentrácia hormónov =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

Výber testovacích koncentrácií

47. Skúška by sa mala nezávisle vykonať minimálne dvakrát. Pokiaľ z predchádzajúcich informácií, ako sú napríklad informácie o limitoch rozpustnosti alebo o cytotoxicite, nevyplýva základ na výber testovacích koncentrácií, odporúča sa, aby testovacie koncentrácie pre prvé vykonanie skúšky boli v intervaloch $\log_{10}$, pričom 10^{-3} M je maximálna koncentrácia. Ak je chemikália rozpustná, nie je cytotoxická pri žiadnej z testovaných koncentrácií a prvý pokus bol negatívny pre všetky koncentrácie, potom sa to potvrdí ďalším vykonaním skúšky za tých istých podmienok, za akých sa vykonával prvý pokus (tabuľka 7). Ak sú výsledky prvého pokusu nejednoznačné (t. j. násobná zmena je štatisticky významná z kontroly s aplikáciou rozpúšťadla len v jednej koncentrácii) alebo pozitívna (t. j. násobná zmena v dvoch alebo viacerých hraničných koncentráciách je štatisticky významná), test by sa mal opakovať, ako sa uvádza v tabuľke 7, upravením zvolených testovacích koncentrácií. Testovacie koncentrácie v druhom a treťom (v náležitých prípadoch) pokuse by sa mali upraviť na základe výsledkov koncentrácií z prvého pokusu, ktoré vyvolali účinok s použitím intervalov koncentrácií v intervaloch 1/2-log (napr. ak výsledkom pôvodného pokusu s 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1 000 µM boli indukcie pri 1 a 10 µM, koncentrácie testované pri druhom pokuse by mali byť 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 µM), pokiaľ sa nemusia použiť nižšie koncentrácie na dosiahnutie LOEC. V druhom prípade by sa v druhom pokuse s použitím 1/2-log stupnice malo použiť najmenej päť koncentrácií menších ako najnižšia koncentrácia testovaná v prvom pokuse. Ak sa v druhom pokuse nepotvrdí prvý pokus (t. j. nenastane štatistická významnosť pri predtým pozitívne testovanej koncentrácii ± 1 zvýšenie koncentrácie), vykoná sa tretí pokus s použitím pôvodných testovacích podmienok. Nejednoznačné

výsledky z prvého pokusu sa považujú za negatívne, ak v žiadnom z ďalších dvoch pokusov nie je možné potvrdiť spozorovaný účinok. Nejednoznačné výsledky sa považujú za pozitívne reakcie (účinkok), keď reakciu možno potvrdiť najmenej v jednom ďalšom pokuse so zvýšením koncentrácie ± 1 (pozri oddiel 55 pre postup interpretácie údajov).

Tabuľka 7

Rozhodovacia matica pre možné výsledné scenáre

pokus 1	pokus 2		pokus 3		rozhodnutie	
scenár	rozhodnutie	scenár	rozhodnutie	scenár	pozitívne	negatívne
negatívne	potvrdené ^(a)	negatívne	ukončenie			X
negatívne	potvrdené ^(a)	pozitívne	upraviť ^(b)	negatívne		X
nejednoznačné ^(c)	upraviť ^(b)	negatívne	potvrdené ^(a)	negatívne		X
nejednoznačné ^(c)	upraviť ^(b)	negatívne	potvrdené ^(a)	pozitívne	X	
nejednoznačné ^(c)	upraviť ^(b)	pozitívne			X	
pozitívne	upraviť ^(b)	negatívne	potvrdené ^(a)	pozitívne	X	
negatívne	potvrdené ^(a)	pozitívne	upraviť ^(b)	pozitívne	X	
pozitívne	upraviť ^(b)	pozitívne	ukončenie		X	

^(a) Potvrdenie predchádzajúceho pokusu s použitím rovnakých podmienok pokusu.

^(b) Opätovné vykonanie skúšky v intervaloch koncentrácie 1/2-log (vymedzenie koncentrácie, ktorá v predchádzajúcom pokuse bola významne iná).

^(c) Násobná zmena v jednej koncentrácii je štatisticky významne odlišná od kontroly s aplikáciou rozpúšťadla.

Kvalita kontroly testovacej platničky

48. Okrem splnenia kritérií pre platničku na kontrolu kvality treba splniť ďalšie kritériá kvality, ktoré sa týkajú prijateľnej variability medzi replikovanými jamkami, opakovanými pokusmi, linearitou a citlivosťou systémov merania hormónov, variabilitou medzi opakovanými meraniami hormónov rovnakej vzorky a percentom výťažnosti vrcholov hormónov po extrakcii média (v náležitých prípadoch; pozri odsek 30 pre požiadavky na extrakciu) a ktoré sa uvádzajú v tabuľke 8. Údaje by sa mali pohybovať v rámci prijateľných rozsahov vymedzených pre každý parameter, ktorý sa posudzuje na ďalšie hodnotenie. Ak tieto kritériá nie sú splnené, v pracovnom hárku treba poznamenať, že kritériá kontroly kvality neboli u predmetnej vzorky splnené, a vzorka by sa mala opäť analyzovať alebo vyradiť zo súboru údajov.

Tabuľka 8

Prijateľné rozsahy a/alebo variabilita (%) pre parametre testovacej platničky skúšky H295R

(LOQ: limit kvantifikácie systému merania hormónov. CV: variačný koeficient; SC: kontrola s aplikáciou rozpúšťadla; DPM: dezintegrácia za minútu)

	Porovnanie medzi	T	E2
Základná produkcia hormónov v SC	Násobne väčšia ako LOQ	≥ 5 -násobne	$\geq 2,5$ -násobne
Expozičné pokusy – CV v rámci platničky pre SC (replikované jamky)	Absolútne koncentrácie	$\leq 30 \%$	$\leq 30 \%$
Expozičné pokusy – CV medzi platničkami pre SC (opakované pokusy)	Násobná zmena	$\leq 30 \%$	$\leq 30 \%$
Systém merania hormónov – citlivosť	Zistiteľné násobné zníženie v pomere k SC	≥ 5 -násobne	$\geq 2,5$ -násobne
Systém merania hormónov – CV opakovaného merania pre SC ^(a)	Absolútne koncentrácie	$\leq 25 \%$	$\leq 25 \%$
Extrakcia média – výťažnosť vnútorného štandardu 3H (v náležitých prípadoch)	DPM	$\geq 65 \%$ nominálne	

^(a) Vztahuje sa na opakované merania rovnakej vzorky.

ANALÝZA ÚDAJOV A PODÁVANIE SPRÁV

Analýza údajov

49. Na hodnotenie relatívneho zvýšenia/zníženia chemicky zmenenej produkcie hormónov by sa výsledky mali normalizovať na strednú hodnotu SC každej testovacej platničky a výsledky by sa mali vyjadriť ako zmeny v pomere k SC na každej testovacej platničke. Všetky údaje sa vyjadria ako stredná hodnota ± 1 štandardná odchýlka (SD).
50. Do analýzy údajov by sa mali začleniť len údaje o hormónoch z jamiek, v ktorých bola cytotoxicita menšia ako 20 %. Relatívne zmeny by sa mali vypočítavať takto:

Relatívna zmena = (koncentrácia hormónov v každej jamke) $\div$ (stredná koncentrácia hormónov vo všetkých jamkách na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla).

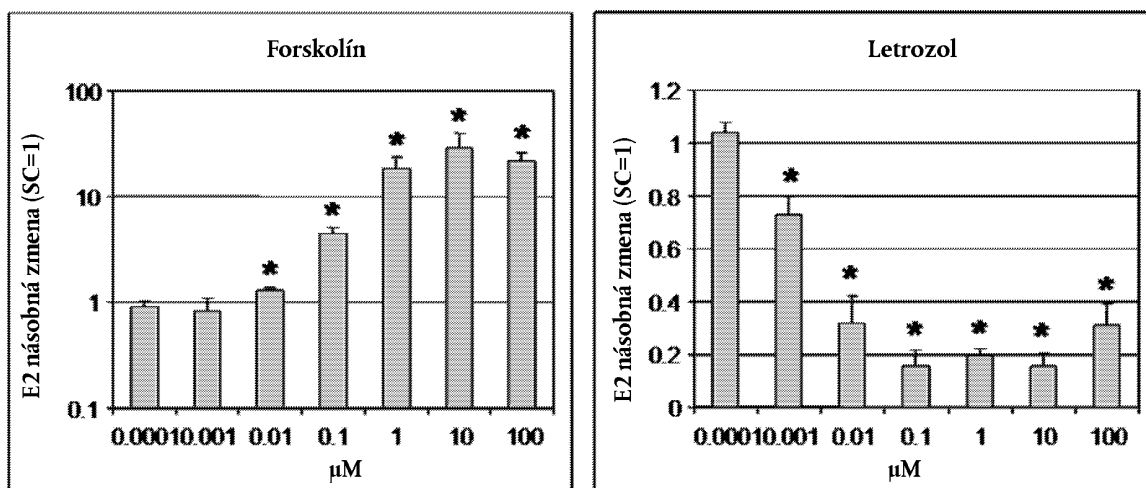
51. Ak by z vizuálneho preskúmania jamky alebo zo skúšky životaschopnosti/cytotoxicity popísanej v odseku 42 vyplynulo zdanlivé zvýšenie počtu buniek, musí sa toto zvýšenie overiť. V prípade, že sa zvýšenie buniek overí, malo by sa to uviesť v protokole z testu.
52. Pred vykonaním štatistických analýz by sa mali posúdiť predpoklady normality a homogénnosti odchýlok. Normalita by sa mala hodnotiť pomocou štandardných diagramov pravdepodobnosti alebo inej vhodnej štatistickej metódy (napr. Shapirov-Wilkov test). Ak údaje (násobné zmeny) nie sú normálne distribuované, malo by sa usilovať o transformáciu údajov na priblíženie sa normálnej distribúcii. Ak sú údaje normálne distribuované alebo sa blízka normálnej distribúcii, rozdiely medzi skupinami koncentrácií chemikálií a kontrolami s aplikáciou rozpúšťadla by sa mali analyzovať s použitím parametrického testu (napr. Dunnettov test), pričom koncentrácia je nezávislá premenná a reakcia (násobná zmena) je závislá premenná. Ak údaje nie sú normálne distribuované, mal by sa použiť vhodný neparametrický test (napr. Kruskalov Wallisov test, test Steela Many-one rank). Rozdiely sa považujú za významné, ak je $p \leq 0,05$. Štatistické vyhodnotenia sa vykonávajú na základe priemerných hodnôt pre každú jamku, ktoré predstavujú nezávislé opakované dátové body. Predpokladá sa, že pre veľké odstupy medzi dávkami v prvom pokuse (stupnica $\log_{10}$) nebude v mnohých prípadoch možné popísať jasné vzťahy medzi koncentráciou a reakciou, keď najväčšie dve dávky budú v lineárnej časti esovitej krivky. Preto sa v prípade prvého pokusu alebo iných súborov údajov, kde sa vyskytuje tento stav (napr. keď nemožno odhadnúť maximálnu účinnosť), použije štatistika pevnej premennej typu I, ako sa už opísalo.

53. Ak v lineárnej časti krivky ležia viac ako dva dátové body a keď možno vypočítať maximálne účinnosti – ako sa predpokladá pre niektoré z druhých pokusov, ktoré sa vykonali s použitím polologaritmických rozstupov medzi expozičnými koncentraciami –, mal by sa na výpočet účinných koncentrácií (napr. EC50 a EC20) použiť probitový, logitový alebo iný vhodný regresný model.
54. Výsledky by sa mali uviesť graficky (stĺpcové grafy predstavujúce strednú hodnotu ± 1 SD) a v tabuľkovom formáte (LOEC/NOEC, smer účinku a sila maximálnej reakcie, ktorá je súčasťou časti údajov o vzťahu medzi dávkou a reakciou) (pozri ako príklad obrázok č. 3). Posúdenie údajov sa považuje za platné, len ak bolo založené na najmenej dvoch nezávisle vykonaných pokusoch. Pokus sa považuje za nezávislý, ak sa vykonal v iný deň s použitím nového súboru roztokov a kontrol. Rozpätie koncentrácií použitých v druhých a tretích pokusoch (ak boli potrebné) sa môže prispôsobiť na základe výsledkov prvého pokusu, aby bol lepšie vymedzený rozsah pre vzťah medzi dávkou a reakciou s LOEC (pozri odsek 47).

Obrázok č. 3

Príklad prezentácie a hodnotenia údajov získaných počas vykonania skúšky H295R v grafickom a tabuľkovom formáte.

Hviezdičky označujú štatisticky významné rozdiely v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla ($p < 0,05$). LOEC: najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom; maximálna zmena: maximálna sila reakcie pozorovanej pri akejkoľvek koncentrácii v pomere k priemernej reakcii SC (= 1)



Chemikália	LOEC	Maximálna zmena
Forskolín	0,01	0,15-násobná
Letrozol	0,001	29-násobná

Postup interpretácie údajov

55. Testovaná chemikália sa považuje za pozitívnu, ak je násobná indukcia štatisticky odlišná ($p \leq 0,05$) od kontroly s aplikáciou rozpúšťadla pri dvoch hraničiacich koncentráciách v najmenej dvoch nezávislých pokusoch (tabuľka č. 7). Testovaná chemikália sa považuje za negatívnu po dvoch nezávislých negatívnych pokusoch alebo po troch pokusoch, z ktorých sú dva negatívne a jeden nejednoznačný alebo pozitívny. Ak údaje z troch nezávislých pokusov nespĺňajú rozhodovacie kritériá uvedené v tabuľke 7, výsledky pokusov nemožno interpretovať. Výsledky dosiahnuté pri koncentráciách, ktoré presahujú limity rozpustnosti, alebo pri cytotoxických koncentráciách by sa nemali začleniť do interpretácie výsledkov.

Správa z testu

56. Správa z testu by mala obsahovať tieto informácie:

Testovacie zariadenie

- názov zariadenia a jeho sídlo;
- riaditeľ štúdie a ostatní zamestnanci a ich úlohy v štúdií;
- dátumy začiatku a konca štúdie;

Testovaná chemikália, reagenty a kontrolné vzorky

- totožnosť (názov alebo č. CAS), zdroj, číslo dávky/série, čistota, dodávateľ a charakterizácia testovanej chemikálie, reagentov a kontrolných vzoriek;
- fyzická povaha a náležité fyzikálnochemické vlastnosti testovanej chemikálie;
- podmienky skladovania a metóda a frekvencia prípravy testovaných chemikálií, reagentov a kontrolných vzoriek;
- stabilita testovanej chemikálie;

Bunky

- zdroj a typ buniek;
- počet pasáží (identifikátor bunkovej pasáže) buniek použitých v teste;
- popis postupov na udržanie bunkových kultúr;

Požiadavky pred testom (ak sa uplatňuje)

- popis a výsledky testu interferencie chemikálie so skúškou hormónov;
- popis a výsledky meraní účinnosti extrakcie hormónov;
- štandardná a kalibračná krivka pre všetky analytické skúšky, ktoré sa majú vykonať;
- detekčné limity pre zvolené analytické skúšky;

Podmienky testu

- zloženie médií;
- koncentrácia testovanej chemikálie;
- hustota buniek (odhadovaná alebo meraná koncentrácia buniek po 24 a 48 hodinách);
- rozpustnosť testovanej chemikálie (hranica rozpustnosti, ak je stanovená);
- inkubačná doba a podmienky;

Výsledky testu

- základné údaje pre každú jamku pre kontrolné vzorky a testované chemikálie – každé opakované meranie vo forme pôvodných údajov z nástroja použitého na meranie produkcie hormónov (napr. OD, fluorescenčné jednotky, DPM atď.);
- validácia normality alebo vysvetlenie transformácie údajov;
- stredné hodnoty reakcií ± 1 SD pre každú meranú jamku;
- údaje o cytotoxicite (testovacie koncentrácie, ktoré spôsobili cytotoxicitu);
- potvrdenie, že boli splnené požiadavky na kontrolu kvality;
- relatívna zmena v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla upravená o cytotoxicitu;
- stĺpcový graf znázorňujúci relatívnu (násobnú) zmenu v jednotlivých koncentráciách, SD a štatistickú významnosť podľa odsekov 49 až 54;

Interpretácia údajov

- uplatnenie postupu interpretácie údajov na výsledky a diskusia o zisteniach;

Diskusia

- Vyplývajú zo štúdie nejaké náznaky týkajúce sa možnosti, že údaje o T/E2 by mohli byť ovplyvnené nepriamymi účinkami na dráhy glukokortikoidov a mineralokortikoidov?

Záver

LITERATÚRA

1. OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v dodatku 2 ku kapitole B.54 v tejto prílohe.
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. Appl. 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. Sci. 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, Paríž. Dostupné na: [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, Paríž. Dostupné na: [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, Dostupné na: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/s/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. Appl. 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. Sci. 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. Sci. 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. Sci. Pol. 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. Chapter B.55 of this Annex: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.
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.
-

Dodatok

VYMEDZENIA POJMOV

Konfluencia označuje prekrytie alebo proliferáciu, ktoré sú bunkám umožnené cez kultivačné médium alebo v kultivačnom médiu.

Chemikália je látka alebo zmes.

CV označuje variačný koeficient, ktorý sa vymedzuje ako pomer štandardnej odchýlky distribúcie k jej aritmetickej strednej hodnote.

CYP označuje cytochróm P450 monooxygenázy, čo je skupina génov a enzýmov z nich produkovaných, ktoré katalyzujú širokú škálu biochemických reakcií vrátane syntézy a metabolizmu steroidných hormónov.

DPM je dezintegrácia za minútu. Je to počet atómov v danom množstve rádioaktívneho materiálu, o ktorom sa zistilo, že sa rozložil za jednu minútu.

E2 je 17 β -estradiol, čo je najdôležitejší estrogén v cicavčích systémoch.

Bunky **H295R** sú bunky ľudského adrenokarcinómu, ktoré majú fyziologické charakteristiky buniek zonálne nediferencovaných ľudských fetálnych nadobličiek a ktoré exprimujú všetky enzýmy steroidogenézy. Dostupné sú z ATCC.

Mraziace médium sa používa na zmrazenie a uskladnenie zmrazených buniek. Tvorí ho zásobné médium plus BD NuSerum a dimetylsulfoxid.

Lineárna časť je časť štandardnej krivky pre systém merania hormónov, kde sú výsledky úmerné koncentrácii analytu prítomného vo vzorke.

LOQ je limit kvantifikácie a označuje najnižšie množstvo chemikálie, pri ktorom možno v rámci stanovenej hranice spoľahlivosti rozpoznať rozdiel od absencie tejto chemikálie (prázdna hodnota). Na účely tejto metódy LOQ zvyčajne vymedzuje výrobca testovacích systémov, ak sa neustanovuje inak.

LOEC je najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom, pri ktorej je reakcia kúšky štatisticky odlišná od reakcie skúšky pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla.

NOEC je koncentrácia bez pozorovaného účinku, čo je najvyššia testovaná koncentrácia, keď zo skúšky nevyplýva pozitívna reakcia.

Pasáž je počet delení buniek po aktivácii kultúry zo zmrazenej zásoby. Prvej pasáži, ktorá sa začala zo zmrazených zásob, sa priradí číslo jedna (1). Bunky, ktoré sa oddelili jedenkrát, sa označia pasáž 2 atď.

PBS je Dulbeccov fosfátovo tlmivý fyziologický roztok.

Kontrola kvality označuje merania potrebné na zaručenie platných údajov.

Platnička na kontrolu kvality je 24-jamková platnička, ktorá obsahuje dve koncentrácie pozitívnych a negatívnych kontrolných vzoriek na sledovanie správania novej dávky buniek alebo na zabezpečenie pozitívnych kontrolných vzoriek pre skúšku pri testovaní chemikálií.

Pokus je nezávislý pokus charakterizovaný novým súborom roztokov a kontrolných vzoriek.

Zásobné médium je základ na prípravu ostatných reagentov. Tvorí ho 1:1 zmes Dulbeccovho modifikovaného Eaglovho média a Hamovej zmesi živín F-12 (DMEM/F12) v 15 mM HEPES tlmivom roztoku bez fenolovej červene a hydrogénuhlčitanu sodného. Hydrogénuhlčitan sodný sa pridáva ako tlmivý roztok, pozri dodatok č. II k validačnej správe (4).

Obohatené médium tvorí zásobné médium plus BD NuSerum a zmes ITS+ premium, pozri dodatok č. II k validačnej správe (4).

Steroidogenéza je syntetická dráha, ktorá vedie od cholesterolu k rôznym steroidným hormónom. Niektoré prostredné hormóny v syntéze steroidov, ako napríklad progesterón a testosterón, sú samé osebe dôležité hormóny, ale slúžia aj ako prekursor hormónov v ďalšej časti syntetickej dráhy.

T označuje testosterón, jeden z dvoch najdôležitejších androgénov v cicavčích systémoch.

Testovaná chemikália je akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Testovacia platnička je platnička, na ktorej sa bunky H295R vystavia pôsobeniu testovaných chemikálií. Testovacie platničky obsahujú kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a testovanú chemikáliu trojmo v siedmich koncentráciách.

Trypsín 1X je zriedený roztok enzýmu trypsín, čo je pankreatická serínová proteáza a používa sa na uvoľnenie buniek z platničky na kultiváciu buniek, pozri dodatok č. III k validačnej správe (4).

B.58. TRANSGÉNNA SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA SOMATICKÝCH BUNKÁCH HLODAVCOV A SKÚŠKA GÉNOVEJ MUTÁCIE NA ZÁRODOČNÝCH BUNKÁCH**ÚVOD**

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 488 (2013). Testovacie metódy EÚ sú dostupné pre široký okruh skúšok mutácie in vitro, ktorými možno odhaliť chromozomálne a/alebo génové mutácie. Existujú testovacie metódy pre sledované parametre in vivo (t. j. chromozomálne aberácie a neplánovaná syntéza DNA), pomocou nich však nie je možné merať génové mutácie. Transgénne skúšky mutácie na bunkách hlodavcov (Transgenic Rodent – TGR) uspokojujú potreby praktických a všeobecne dostupných testov génových mutácií in vivo.
2. Skúšky mutácie TGR sa značne revidovali (24) (33). Využívajú sa pri nich transgénne potkany a myši, ktoré obsahujú viaceré kópie chromozómne integrovaných plazmidových alebo fágových dvojfunkčných vektorov (shuttle vektory). Prenesené gény obsahujú reportérové gény na detekciu rôznych typov mutácií vyvolaných testovanými chemikáliami in vivo.
3. Mutácie vyskytujúce sa v hlodavcoch sa hodnotia získaním preneseného génu a analýzou fenotypu reportérového génu v bakteriálnom hostiteľovi, ktorému chýba reportérový gén. Skúškami génovej mutácie TGR sa merajú mutácie spôsobené v geneticky neutrálnych génoch získaných prakticky z akéhokoľvek tkaniva hlodavca. Tieto skúšky preto obchádzajú mnohé z existujúcich limitácií spojených so štúdiou in vivo génovej mutácie v endogénnych génoch (napr. obmedzené tkanivá vhodné na analýzu, negatívna/pozitívna selekcia vo vzťahu k mutáciám).
4. Z váhy dôkazov vyplýva, že prenesené gény reagujú na mutagénny podobne ako endogénne gény, najmä pokiaľ ide o detekciu bázových zámien, mutácií spôsobujúcich posun čítacieho rámca a malé delécie a včlenenia (24).
5. Na medzinárodných seminároch o testovaní genotoxicity (IWGT) sa podporilo začlenenie skúšok génových mutácií TGR na zisťovanie génových mutácií in vivo a odporučil sa protokol na ich vykonávanie (15) (29). Táto testovacia metóda je založená na týchto odporúčaní. Ďalšie analýzy podporujúce používanie tohto protokolu možno nájsť v (16).
6. Predpokladá sa, že v budúcnosti bude možné skombinovať skúšku génovej mutácie TGR so štúdiou toxicity po opakovanej dávke (kapitola B.7 tejto prílohy). Sú však potrebné údaje na uistenia sa, či citlivosť skúšky génovej mutácie TGR nebola ovplyvnená kratším jednoduchým časovým úsekom od konca doby podávania do času odberu vzoriek, ktorý sa používa v štúdiu toxicity po opakovanej dávke, v porovnaní s 3 dňami používanými v skúškach génovej mutácie TGR. Tiež sú potrebné údaje na preukázanie, že výsledky skúšky po opakovanej dávke nie sú nepriaznivo ovplyvnené použitím transgénnych kmeňov hlodavcov namiesto použitia tradičných kmeňov hlodavcov. Keď budú tieto údaje dostupné, táto testovacia metóda sa upraví.
7. Vymedzenia základných pojmov sa uvádza v dodatku.

ÚVODNÉ ÚVAHY

8. Skúšky génovej mutácie TGR, pre ktoré sú dostupné dostatočné údaje na podporu ich využitia v tejto testovacej metóde, sú: lacZ bakteriofágové myši (Muta™Mouse); lacZ plazmidové myši; gpt delta (gpt a Spi⁻) myši a potkany; lacI myši a potkany (Big Blue®), vykonávané za štandardných podmienok. Ďalej sa môže na hodnotenie mutácií v modeloch Big Blue® a Muta™Mouse použiť skúška pozitívnej selekcie cII. Mutagenéza v modeloch TGR sa normálne posudzuje ako frekvencia mutácií, ak sa však požaduje, môže molekulárna analýza mutácií poskytnúť ďalšie informácie (pozri odsek 24).
9. Tieto testy in vivo génovej mutácie na hlodavcoch sú osobitne významné na posudzovanie mutagénneho rizika, keďže reakcie skúšok závisia od metabolizmu in vivo, farmakokinetiky, procesu obnovy DNA a translácie syntézy DNA, hoci tie sa môžu líšiť medzi jednotlivými druhmi, tkanivami a typmi poškodenia DNA. Skúška in vivo génových mutácií je užitočná na ďalšie skúmanie mutagénneho účinku zisteného systémom in vitro a na sledovanie výsledkov testov s použitím iných sledovaných parametrov in vivo (24). Okrem toho, že génová mutácia je kauzálne spojená s indukciou rakoviny, je relevantným sledovaným parametrom na predikciu nerakovinových chorôb založených na mutáciách v somatických tkanivách (12) (13), ako aj chorôb prenášaných zárodočnou líniou.

10. Ak existujú dôkazy, že testovaná chemikália alebo relevantný metabolit nedosiahne žiadne príslušné tkanivo, nie je vhodné vykonať skúšku génovej mutácie TGR.

PRINCÍP TESTU

11. V skúškach popísaných v odseku 8 má cieľový gén bakteriálny alebo bakteriofágový pôvod a na získanie z genómovej DNA hlodavcov sa prenesený gén začlení do λ bakteriofágového alebo plazmidového dvojfunkčného vektora. Postup zahŕňa extrakciu genómovej DNA z príslušného tkaniva hlodavca, spracovanie genómovej DNA in vitro (t. j. spájanie λ vektorov alebo ligácia a elektroporácia plazmidov na získanie dvojfunkčného vektora) a následné zisťovanie mutácií v bakteriálnych hostiteľoch vo vhodných podmienkach. V skúške sa využívajú neutrálne prenesené gény, ktoré možno jednoducho získať z väčšiny tkanív.
12. Základný pokus génovej mutácie TGR zahŕňa podávanie chemikálie hlodavcom počas určitého obdobia. Chemikálie možno podávať akýmkoľvek vhodným spôsobom, a to aj vrátane implantácie (napr. testovanie s lekárskeym prístrojom). Celkové obdobie, počas ktorého sa zvieratá dávajú dávky sa nazýva doba podávania. Po podávaní zvyčajne nasleduje pred usmrtením časové obdobie, počas ktorého sa chemikália nepodáva a počas ktorého sa neobnovené lézie DNA fixujú do stabilných mutácií. V literatúre sa toto obdobie rôzne nazýva aj ako čas prejavov, čas fixácie alebo čas expzie; koniec tohto obdobia je čas odberu vzoriek (15) (29). Po usmrtení zvierat sa genómová DNA izoluje z príslušného tkaniva a prečistí sa.
13. Údaje z jedného tkaniva z jedného zvieratá z viacerých spojení/ligácií sa zvyčajne agregujú a všeobecne sa hodnotí frekvencia mutácií s použitím súčtu od 10^5 do 10^7 jednotiek tvoriacich plaky alebo jednotiek tvoriacich kolónie. Keď sa používajú metódy pozitívnej selekcie, celkový počet jednotiek tvoriacich plaky sa určí s osobitným súborom neselektívnych platničiek.
14. Metódy pozitívnej selekcie sa vypracovali na uľahčenie zisťovania mutácií v gpt géne [gpt delta myši a potkany, gpt - fenotyp (20) (22) (28)] a lacZ géne [Muta™Mouse alebo lacZ plazmidové myši (3) (10) (11) (30)]; pričom génové mutácie lacI vo zvieratách Big Blue® sa zisťujú pomocou neselektívnej metódy, ktorou sa identifikujú mutácie prostredníctvom tvorby sfarbených (modrých) plakov. Metodológia pozitívnej selekcie funguje aj na určenie bodových mutácií vznikajúcich v cII géne λ bakteriofágového dvojfunkčného vektora [Big Blue® myši alebo potkany, a Muta™Mouse (17)] a delečných mutácií v λ červených a gam génoch [Spi - selekcia v gpt delta myšiach a potkanoch (21) (22) (28)]. Frekvencia mutácií sa vypočítava vydelením počtu plakov/plazmidov obsahujúcich mutácie v prenesenom géne celkovým počtom plakov/plazmidov získaných z tej istej vzorky DNA. V štúdiách génovej mutácie TGR je frekvencia mutácií vykazovaným parametrom. Frekvencia mutácií sa ďalej môže určiť ako podiel buniek s nezávislými mutáciami; tento výpočet si vyžaduje úpravu klonovej expanzie sekvenciou zotavených mutantov (24).
15. Mutácie hodnotené v skúškach lacI, lacZ, cII a bodovej mutácie gpt pozostávajú hlavne z mutácií bázevej zámény, mutácií posúvajúcich čítací rámec a z malých včlenení/delcií. Relatívny podiel týchto typov mutácií v spontánných mutáciách je podobný ako ich relatívny podiel v endogénnom géne Hprt. Veľké delcie sa zisťujú výhradne so skúškami selekcie Spi - a plazmidov lacZ (24). Zaujímavé mutácie sú mutácie in vivo, ktoré vznikajú v myšiach alebo potkanoch. Mutácie in vitro a ex vivo, ktoré môžu vzniknúť počas získania, replikácie alebo opravy fág/plazmidu sú pomerne zriedkavé a v niektorých systémoch ich možno špecificky identifikovať alebo vylúčiť pomocou systému bakteriálneho hostiteľa/pozitívnej selekcie.

OPIS METÓDY

Príprava

Výber druhov zvierat

16. V súčasnosti sú dostupné rôzne modely zisťovania génovej mutácie transgénnych myši a tieto systémy sa používajú viac ako modely využívajúce transgénne potkany. Ak je potkan jednoznačne vhodnejším modelom ako myš (napr. pri skúmaní mechanizmu karcinogenézy tumoru zisteného len u potkanov, na koreláciu so štúdiou toxicity na potkanoch, alebo keď je známe, že metabolizmus potkanov lepšie znázorňuje ľudský metabolizmus), malo by sa zväžiť použitie modelov využívajúcich transgénne potkany.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by ideálne mala byť 22 °C ($\pm$ 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno nemala by prevyšovať 70 % okrem času čistenia miestnosti, cieľom je udržať relatívnu vlhkosť v rozmedzí 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, denne by sa malo striedať 12 hodín svetla s 12 hodinami tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá by mali byť umiestnené v malých skupinách (najviac päť) rovnakého pohlavia, pokiaľ sa nepredpokladá agresívne správanie. Ak to je vedecky opodstatnené, zvieratá môžu byť umiestnené samostatne.

Príprava zvierat

18. Zdravé mladé, pohlavne dospelé zvieratá (staré 8 až 12 týždňov na začiatku pokusu) sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Zvieratá sa jedinečne označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní. Kletky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vyplývajúce z umiestnenia kliebok. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť $\pm$ 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

Príprava dávok

19. Pevné testované chemikálie by sa pred podávaním dávok zvieratám mali rozpustiť alebo suspendovať vo vhodných rozpúšťadlách alebo nosičoch alebo primiešať do krmiva alebo pitnej vody. Kvapalné testované chemikálie sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. V prípade inhalačných expozícií sa testované chemikálie môžu v závislosti od svojich fyzikálochemických vlastností podávať ako plyn, výpary alebo tuhé/kvapalné aerosóly. Používajú sa čerstvé prípravky testovanej chemikálie, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

Podmienky skúšky*Rozpúšťadlo/nosič*

20. Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných objemoch dávok a nemali by chemicky reagovať s testovanou chemikáliou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi, ktoré poukazujú na ich kompatibilitu. Vždy, keď to je možné, odporúča sa zvážiť použitie najprv vodného rozpúšťadla/nosiča.

Pozitívne kontrolné vzorky

21. Obyčajne by sa mali používať zvieratá na paralelnú pozitívnu kontrolu. V prípade laboratórií, ktoré preukázali spôsobilosť (pozri odsek 23) a bežne používajú tieto skúšky, sa však na potvrdenie úspechu metódy môžu do každej štúdie začleniť DNA z pokusných zvierat z predchádzajúcich pozitívnych kontrol. Tieto DNA z predchádzajúcich pokusov by mali byť získané z rovnakých druhov a príslušných tkanív a mali by byť vhodne uskladnené (pozri odsek 36). Keď sa používajú paralelné pozitívne kontrolné vzorky, nie je potrebné podávať ich rovnakým spôsobom ako testovanú chemikáliu; o pozitívnych kontrolných vzorkách by však malo byť známe, že spôsobujú mutácie v jednom tkanive alebo vo viacerých tkanivách, ktoré sú relevantné pre testovanú chemikáliu. Dávky pozitívnych kontrolných chemikálií by sa mali zvoliť tak, aby spôsobovali slabé alebo mierne účinky, ktoré kriticky stanovujú výsledky a citlivosť skúšky. Príklad pozitívnych kontrolných chemikálií a niektorých ich cieľových tkanív sa uvádzajú v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady pozitívnych kontrolných chemikálií a niektorých ich cieľových tkanív

Pozitívna kontrolná chemikália a č. CAS	Názov Eines a č. Eines	Charakteristika	Cieľové tkanivo mutácie	
			potkan	myš
N-etyl-N-nitrozmočovina (č. CAS 759-73-9)	N-etyl-N-nitrozmočovina (212-072-2)	priamo pôsobiaci mutagén	pečeň, pľúca	kostná dreň, hrubé črevo, epitel hrubého čreva, tenké črevo, pečeň, pľúca, slezina, obličky, vaječníkové folikulárne bunky, samčie zárodočné bunky

Pozitívna kontrolná chemikália a č. CAS	Názov Eines a č. Eines	Charakteristika	Cieľové tkanivo mutácie	
			potkan	myš
etylkarbamát (uretán) (č. CAS 51-79-6)	uretán (200-123-1)	mutagén, vyžaduje metabolizmus alebo spôsobuje len slabé účinky.		kostná dreň, predžalúdok, tenké črevo, pečeň, pľúca, slezina
2,4-diaminotoluén (č. CAS 95-80-7)	4-metyl-m-fenyléndiamín (202-453-1)	mutagén, vyžaduje metabolizmus, pozitívny aj v skúške Spi	pečeň	pečeň
benzo[a]pyrén (č. CAS 50-32-8)	benzo[def]chryzén (200-028-5)	mutagén, vyžaduje metabolizmus	pečeň, omentum	kostná dreň, prsia, hrubé črevo, predžalúdok, žľaznatý žalúdok, srdce, pečeň, pľúca, samčie zárodočné bunky

Negatívne kontrolné vzorky

22. Pre každý čas odberu vzoriek by sa mali začleniť negatívne kontrolné vzorky ošetrované len s rozpúšťadlom alebo nosičom, s ktorými sa inak zaobchádza rovnako ako s pokusnými skupinami. Ak neexistujú historické alebo zverejnené kontrolné údaje, ktoré by preukazovali, že zvolené rozpúšťadlo/nosič nespôsobujú žiadne zhubné ani mutagénne účinky, neošetrované kontrolné vzorky by sa mali zaradiť aj pre každý čas odberu vzoriek na stanovenie prijateľnosti kontrolnej skupiny, ktorej bol podaný nosič.

Overenie spôsobilosti laboratória

23. Spôsobilosť v týchto skúškach by sa mala určiť preukázaním schopnosti reprodukovat' predpokladané výsledky zo zverejnených údajov (24) pre: 1) frekvencie mutácií s pozitívnymi kontrolnými chemikáliami (vrátane slabých reakcií), ako sa napríklad uvádzajú v tabuľke 1, s nemutagénnymi kontrolami a kontrolami s podávaním nosiča; a 2) získanie preneseného génu z genómovej DNA (napr. účinnosť spájania).

Sekvenovanie mutácií

24. Pokiaľ ide o uplatňovanie noriem, sekvenovanie DNA mutácií sa nevyžaduje, najmä v prípadoch, keď sa získa jasný pozitívny alebo negatívny výsledok. Údaje o sekvenovaní však môžu byť užitočné v prípade spozorovania vysokej variácie medzi jednotlivcami. V takýchto prípadoch sa sekvenovanie môže použiť na vylúčenie možnosti výnimočných (jackpots) alebo klonových udalostí identifikáciou podielu jedinečných mutácií z konkrétneho tkaniva. Sekvenovanie približne 10 mutácií na jedno tkanivo na jedno zviera by malo postačovať na jednoduché určenie, či klonové mutácie zvyšujú frekvenciu mutácií; sekvenovanie až 25 mutácií môže byť potrebné na matematickú korekciu mutácií o klonalitu. Sekvenovanie mutácií sa môže zväziť aj v prípade zistenia malých zvýšení frekvencie mutácií (t. j. ktoré len presahujú hodnoty neošetrovanej kontrolnej skupiny). Rozdiely v spektre mutácií medzi kolóniami mutácií a pokusnými a kontrolnými zvieratami môžu potvrdiť mutagénny účinok (29). Mutačné spektrá môžu byť užitočné aj na vývoj mechanistických hypotéz. Keď sa má sekvenovanie začleniť ako súčasť protokolu z testu, musí sa osobitne dbať na plán týchto štúdií, najmä pokiaľ ide o počet sekvenovaných mutácií na vzorku, aby sa dosiahla dostatočná výpovedná hodnota podľa použitého štatistického modelu (pozri odsek 43).

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

25. Počet zvierat v skupine by sa mal vopred určiť tak, aby bol dostatočne štatisticky významný na zistenie aspoň zdvojenia vo frekvencii mutácií. Skupiny by mali pozostávať najmenej z piatich zvierat, ak je však štatistická výpovedná hodnota nedostatočná, počet zvierat by sa mal príslušne zvýšiť. Bežne by sa mali používať samce. Môžu sa vyskytnúť prípady, keď je opodstatnené testovanie len samičiek, napríklad pri testovaní liekov určených pre ženy alebo pri skúmaní ženského/samičieho metabolizmu. Ak existujú medzi pohlaviami významné rozdiely, pokiaľ ide o toxicitu alebo metabolizmus, potrebné sú samce a aj samice.

Obdobie podávania

26. Na základe pozorovaní, že mutácie pribúdajú s každým ošetrením, je potrebný režim s opakovanou dávkou s dennými ošetreniami počas obdobia 28 dní. Všeobecne sa to považuje za prijateľné na produkciu dostatočnej akumulácie mutácií slabými mutagénmi a aj na zabezpečenie času vystavenia dostačujúceho na zistenie mutácií v orgánoch s pomalou proliferáciou. Pre niektoré hodnotenia môžu byť vhodné alternatívne režimy podávania a tieto iné rozvrhy podávania by mali byť v protokole vedecky odôvodnené. Ošetrovania by nemali byť kratšie ako čas potrebný na úplnú indukciu všetkých relevantných metabolizujúcich enzýmov a kratšie ošetrovania si môžu vyžadovať použitie viacerých rôznych časov odberu vzoriek, ktoré sú vhodné pre orgány s rôznymi mierami proliferácie. V každom prípade by sa pri odôvodňovaní protokolu mali použiť všetky dostupné informácie (napr. o všeobecnej toxicite alebo o metabolizme a farmakokinetike), najmä v prípade odchýlenia sa od uvedených odporúčaní. Hoci to môže zvýšiť citlivosť, čas ošetrovania dlhší ako 8 týždňov by sa mal jasne vysvetliť a odôvodniť, pretože dlhý čas ošetrovania môže klonovou expanziou spôsobiť zrejme zvýšenie frekvencie mutácií (29).

Veľkosti dávok

27. Veľkosti dávok by mali vychádzať z výsledkov štúdie na zistenie rozsahu dávok s meraním všeobecnej toxicity, ktorá sa vykonala rovnakým spôsobom expozície, alebo z výsledkov vopred existujúcich štúdií subakútnej toxicity. Na určenie rozsahov dávok sa môžu použiť netransgénne zvieratá rovnakého kmeňa hlodavcov. V hlavnom teste by kompletná štúdia na získanie informácií o vzťahu medzi dávkou a reakciou mala zahŕňať negatívnu kontrolnú skupinu (pozri odsek 22) a minimálne tri veľkosti dávok s vhodnými rozstupmi okrem prípadov, keď bola použitá limitujúca dávka (pozri odsek 28). Najvyššia dávka by mala byť maximálna tolerovaná dávka (MTD). Maximálna tolerovaná dávka sa vymedzuje ako dávka produkujúca známky toxicity na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili letalitu. Chemikálie s osobitnými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) a chemikálie, ktoré vykazujú saturáciu toxikokinetických vlastností, môžu byť vyňaté z kritérií na stanovenie dávok a mali by sa hodnotiť prípad od prípadu. Veľkosti dávok by mali pokrývať rozsah od maximálnej po malú, resp. žiadnu toxicitu.

Limitný test

28. Ak z pokusov na zistenie rozsahu alebo z existujúcich údajov týkajúcich sa súvisiacich kmeňov hlodavcov vyplýva, že režim podávania aspoň limitujúcej dávky (pozri nižšie) nespôsobuje žiadne pozorovateľné toxické účinky, a ak sa genotoxicita neočakáva ani na základe údajov zo štruktúrne príbuzných chemikálií, nepovažuje sa za nevyhnutné uskutočniť celú štúdiu s použitím troch veľkostí dávok. V prípade obdobia podávania v trvaní 28 dní (t. j. 28 denných podaní) je limitujúca dávka 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň. V prípade obdobia podávania kratšieho ako 14 dní je limitujúca dávka 2 000 mg/kg telesnej váhy/deň (rozvrhy dávok iné než 28 denných podaní by mali byť v protokole vedecky odôvodnené, pozri odsek 26).

Podávanie dávok

29. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubacej kanyly. Pri plánovaní skúšky by sa všeobecne mal zvážiť predpokladaný spôsob expozície ľudí. Preto môžu byť prijateľné iné spôsoby expozície (ako napríklad pitná voda, subkutánne, intravenózne, lokálne, inhalácia, intratracheálne, strava alebo implantácia), keď ich možno odôvodniť. Intraperitoneálna injekcia sa neodporúča, keďže to nie je fyziologicky relevantný spôsob expozície ľudí. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti pokusného zvierata. Objem by nemal byť väčší ako 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Požitie objemov väčších ako uvedený by malo byť opodstatnené. Okrem dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky pri vyšších koncentráciách, by sa variabilita testovacieho objemu mala minimalizovať upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu pri všetkých veľkostiach dávok.

Čas odberu vzoriek

Somatické bunky

30. Čas odberu vzoriek je kritickou premennou, keďže ho určuje doba potrebná na fixáciu mutácií. Táto doba závisí od tkaniva a zrejme súvisí s dobou zmeny bunkovej populácie, pričom kostná dreň a tenké črevo reagujú rýchlo a pečeň reaguje omnoho pomalšie. Vhodným kompromisom na meranie frekvencií mutácií v tkanivách s rýchlou

a aj pomalou proliferáciou sú denné režimy podávania po dobu 28 po sebe nasledujúcich dní (ako sa uvádza v odseku 26) a odber vzoriek tri dni po záverečnom podaní, hoci maximálna frekvencia mutácií sa v tkanivách s pomalou proliferáciou za týchto podmienok nemusí prejavíť. Ak sú tkanivá s pomalou proliferáciou osobitne významné, môže byť vhodnejší neskorší čas odberu vzoriek v trvaní 28 dní nasledujúci po období podávania v trvaní 28 dní (16) (29). V takýchto prípadoch by neskorší čas odberu vzoriek nahradil čas odberu vzoriek 3 dni a vyžadoval by si vedecké odôvodnenie.

Zárodočné bunky

31. Skúšky TGR sú vhodné na skúmanie indukcie génovej mutácie v mužských zárodočných bunkách (7) (8) (27), v ktorých sú dobre vymedzené časové rozvrhnutie a kinetika spermatogenézy (27). Nízky počet vajíčok dostupných na analýzu, dokonca aj po superovulácii, a skutočnosť, že v oocyte nie je syntéza DNA, vylučujú určenie mutácie v ženských zárodočných bunkách s použitím transgénnych skúšok (31).
32. Časy odberu vzoriek mužských zárodočných buniek by mali byť zvolené tak, aby sa odobrala vzorka z celého rozsahu exponovaných typov buniek v celom vývoji zárodočných buniek a aby stupeň, na ktorý je odber vzoriek zameraný, bol vystavený dostatočnej expozícii. Čas prechodu vyvíjajúcich sa zárodočných buniek zo spermatogoniálnych kmeňových buniek na dospelé spermie, ktoré sa dostanú do semenovodu/chvosta semenníka, je ~49 dní u myši (36) a ~70 dní u potkanov (34) (35). Po 28-dňovej expozícii s následnou dobou 3 dní odberu vzoriek predstavujú naakumulované spermie zhromaždené zo semenovodu/chvosta semenníka (7) (8) populáciu buniek exponovaných počas približne druhej polovice spermatogenézy, čo zahŕňa meiotické a postmeiotické obdobie, ale nie obdobie spermatogoniálnych buniek alebo obdobie kmeňových buniek. Na primeraný odber vzoriek buniek v semenovode/chvoste semenníka, ktoré boli spermatogoniálnymi kmeňovými bunkami počas obdobia expozície, je po skončení podávania potrebný ďalší čas na odber vzoriek v trvaní minimálne 7 týždňov (myši) alebo 10 týždňov (potkany).
33. Bunky extrudované zo semenotvorných tubulov po režime 28 + 3 dni tvoria zmiešanú populáciu obohatenú o všetky stupne vyvíjajúcich sa zárodočných buniek (7) (8). Odber vzoriek z týchto buniek na zistenie génovej mutácie neposkytuje také presné posúdenie stupňov, v ktorých boli indukované mutácie zárodočných buniek, aké možno získať z odberu vzoriek spermií zo semenovodu/chvostu semenníka (keďže tam sú rôzne typy zárodočných buniek, z ktorých sa odobrali vzorky z tubulov, a bude tam niekoľko somatických buniek, ktoré kontaminujú túto populáciu buniek). Odber vzoriek zo semenotvorných tubulov spoločne so spermiami zo semenovodu/chvostu semenníka len v režime 28 + 3 dni by však určitým spôsobom pokryl bunky exponované vo väčšine fáz vývoja zárodočných buniek a mohol by byť užitočný na zistenie určitých mutagénov zárodočných buniek.

Pozorovania

34. Najmenej raz denne je nutné uskutočniť všeobecné klinické pozorovania, najlepšie vždy v tom istom čase s ohľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po podaní. Mal by sa zaznamenať zdravotný stav zvierat. Najmenej dvakrát denne je potrebné sledovať chorobnosť a úmrtnosť zvierat. Všetky zvieratá by sa mali vážiť najmenej raz za týždeň a pri usmrtení. Spotreba potravy by sa mala merať aspoň raz týždenne. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody by sa mala merať pri každej výmene vody a aspoň raz za týždeň. Zvieratá, ktoré vykazujú neletálne ukazovatele nadmernej toxicity, by mali byť usmrtené pred dokončením testovacieho obdobia (23).

Zhromažďovanie tkaniva

35. Treba jasne vymedziť odôvodnenie zhromažďovania tkanív. Keďže indukciu mutácie je možné skúmať prakticky v každom tkanive, výber zhromažďovaných tkanív by mal byť založený na dôvode vykonania štúdie a na akýchkoľvek existujúcich údajoch o mutagenite, karcinogenite alebo toxicite skúmanej chemikálie. Medzi dôležité posudzované faktory patrí spôsob podávania (založený na pravdepodobnom spôsobe expozície ľudí), predpokladaná tkanivová distribúcia a možný mechanizmus účinku. Ak neexistujú žiadne podkladové informácie, mali by sa zhromažďovať viaceré somatické tkanivá, ktoré by mohli byť významné. Tie by mali predstavovať tkanivá s rýchlou proliferáciou, pomalou proliferáciou a plochy kontaktných tkanív. Okrem toho by sa mali zhromažďovať spermie zo semenovodu/chvosta semenníka a vyvíjajúce sa zárodočné bunky zo semenotvorných tubulov (ako sa opisuje v odsekoch 32 a 33), ktoré by sa mali uskladniť pre prípad, žeby bola v budúcnosti potrebná analýza mutagenity zárodočných buniek. Orgány by sa mali vážiť a v prípade väčších orgánov by sa mala zo všetkých zvierat zhromažďovať rovnaká časť.

Uskladňovanie tkanív a DNA

36. Tkanivá (alebo homogenáty tkanív) by sa mali uskladňovať pri teplote nižšej ako - 70 °C a na izoláciu DNA by sa mali použiť do 5 rokov. Izolovaná DNA, uchovávaná zmrazená pri teplote 4 °C vo vhodnom tlmivom roztoku, by sa mala na analýzu mutácií optimálne použiť do jedného roka.

Výber tkanív na analýzu mutácií

37. Výber tkanív by mal byť založený na týchto úvahách: 1) spôsob podávania alebo miesta prvého kontaktu (napr. žľaznatý žalúdok pri orálnom podávaní, pľúca pri podávaní prostredníctvom inhalácie alebo koža pri lokálnej aplikácii); a 2) farmakokinetické parametre pozorované v štúdiách všeobecnej toxicity, z ktorých vyplýva tkanivová dispozícia, retencia alebo akumulácia alebo cieľové orgány toxicity. Ak sa štúdie vykonávajú v nadväznosti na štúdie karcinogenity, mali by sa zväziť cieľové tkanivá karcinogenity. Výberom tkanív pre analýzu by sa mala maximalizovať detekcia chemikálií, ktoré sú priamo pôsobiacimi mutagénmi in vitro, ktoré sa rýchlo metabolizujú, sú vysoko reaktívne alebo sa zle absorbujú alebo u ktorých je cieľové tkanivo určené spôsobom podávania (6).
38. Ak neexistujú podkladové informácie a po zvážení miesta kontaktu vyplývajúceho zo spôsobu podávania by sa mali na mutagenitu posudzovať pečeň a najmenej jedno rýchlo sa deliace tkanivo (napr. žľaznatý žalúdok, kostná dreň). Vo väčšine prípadov možno uvedené požiadavky splniť analýzou dvoch starostlivo vybraných tkanív, ale v niektorých prípadoch môžu byť potrebné tri alebo viaceré tkanivá. Ak existujú dôvody na osobitné znepokojenie s ohľadom na účinky na zárodočné bunky vrátane pozitívnych reakcií v somatických bunkách, mali by sa tkanivá zárodočných buniek hodnotiť na mutácie.

Metódy merania

39. Na detekciu mutácií sú dostupné štandardné laboratórne alebo zverejnené metódy pre odporúčané transgénne modely: lacZ lambda bakteriofág a plazmid (30); lacI myši (2) (18); gpt delta myši (22); gpt delta potkany (28); cII (17). Zmeny by mali byť opodstatnené a riadne zdokumentované. Údaje z viacerých spojení možno agregovať a použiť na dosiahnutie primeraného počtu plakov alebo kolónií. Keď je však na dosiahnutie primeraného počtu plakov potrebný väčší počet spájacích reakcií, môže to byť znak nekvalitnej DNA. V týchto prípadoch by sa údaje mali posudzovať opatrne, pretože môžu byť nespoľahlivé. Optimálny celkový počet plakov alebo kolónií na vzorku DNA určuje štatistická pravdepodobnosť zistenia dostatočného počtu mutácií pri danej frekvencii spontánnych mutácií. Vo všeobecnosti je potrebných minimálne 125 000 až 300 000 plakov, ak je frekvencia spontánnych mutácií v ráde 3×10^{-5} (15). V prípade skúšky Big Blue® lacI je dôležité preukázať, že možno zistiť celý rad fenotypov farebných mutácií začlenením vhodných farebných kontrol súbežne s každým očkovaním. Tkanivá a výsledné vzorky (položky) by sa mali spracúvať a analyzovať s použitím blokového dizajnu, v rámci ktorého sa položky z kontrolnej skupiny používajúcej nosič/rozpúšťadlo, z pozitívnej kontrolnej skupiny (ak sa používa) alebo z pozitívnej kontrolnej DNA (v náležitých prípadoch) a z každej pokusnej skupiny spracúvajú spoločne.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV**Spracovanie výsledkov**

40. Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Pokusnou jednotkou je jedno zviera. Správa by mala obsahovať celkový počet jednotiek tvoriacich plaky (pfu) alebo jednotiek tvoriacich kolónie (cfu), počet mutácií a frekvenciu mutácií pre každé tkanivo z každého zvieraťa. V prípade viacerých spájacích/záchranných reakcií treba uviesť počet reakcií na vzorku DNA. Treba si uchovávať údaje pre každú jednotlivú reakciu, vykazujú sa však len celkové jednotky tvoriace plaky a jednotky tvoriace kolónie. Treba vykazovať údaje o toxicite a o klinických príznakoch podľa odseku 34. Mali by sa predkladať všetky výsledky sekvenovania pre každú analyzovanú mutáciu a mali by sa uviesť výpočty vyplývajúcej frekvencie mutácií pre každé zviera a tkanivo.

Štatistické vyhodnocovanie a interpretácia výsledkov

41. Je viacero kritérií na určenie pozitívneho výsledku, ako je zvýšenie frekvencie mutácií súvisiace s dávkou alebo jasné zvýšenie frekvencie mutácií v skupine s jednou dávkou v porovnaní s kontrolnou skupinou používajúcou rozpúšťadlo/nosič. Na zabezpečenie dostatočných údajov na analýzu vzťahu medzi dávkou a reakciou treba analyzovať najmenej tri pokusné skupiny. Biologická relevantnosť výsledkov by si mala byť prvoradá, pri vyhodnocovaní výsledkov testov sa však ako pomôcka môžu použiť vhodné štatistické metódy (4) (14) (15) (25) (26). V použitých štatistických testoch by sa malo zviera posudzovať ako pokusná jednotka.

42. Testovaná chemikália, ktorej výsledky nespĺňajú uvedené kritériá v žiadnom tkanive, sa v tejto skúške nepovažuje za mutagénnu. Pre biologickú relevantnosť negatívneho výsledku treba potvrdiť expozíciu tkaniva.
43. Pre sekvenčné analýzy DNA sú dostupné viaceré štatistické postupy, ktoré pomáhajú pri interpretácii výsledkov (1) (5) (9) (19).
44. Zváženie toho, či sú pozorované hodnoty v rozsahu historickej kontroly alebo mimo nej, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu reakcie (32).

Správa z testu

45. Správa z testu by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

- identifikačné údaje a číslo CAS, ak je známe;
- zdroj, číslo dávky, ak je k dispozícii;
- fyzikálna povaha a čistota;
- fyzikálnochemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie;
- stabilita testovanej chemikálie, ak je známa;

Rozpúšťadlo/nosič:

- odôvodnenie voľby nosiča;
- rozpustnosť a stabilita testovanej chemikálie v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa;
- príprava zloženia krmiva, pitnej vody alebo inhalácie;
- analytické určenie zložení (napr. stabilita, homogénnosť, nominálne koncentrácie);

Pokusné zvieratá:

- použité druhy/kmeň a odôvodnenie voľby;
- počet, vek a pohlavie zvierat;
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.;
- hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu;

Podmienky testu:

- údaje o pozitívnych a negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) kontrolných skupinách;
- údaje zo štúdie na zistenie rozsahu;
- odôvodnenie výberu veľkosti dávky;
- podrobné údaje o príprave testovanej chemikálie;
- podrobné údaje o podávaní testovanej chemikálie;
- odôvodnenie spôsobu podávania;
- metódy merania toxicity zvierat vrátane, keď to je možné, histopatologických alebo hematologických analýz, a frekvencia pozorovaní a vážení zvierat;
- metódy overovania, či testovaná chemikália dosiahla cieľové tkanivo alebo všeobecnú cirkuláciu, ak sa dosiahnu negatívne výsledky;
- skutočná dávka (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) vypočítaná z koncentrácie testovanej chemikálie (ppm) v krmive/pitnej vode a zo spotreby krmiva/pitnej vody, ak sa uplatňuje;
- podrobné údaje o kvalite krmiva a vody;
- podrobný popis rozvrhov podávania a odoberania vzoriek a odôvodnenie volieb;

- metóda eutanázie;
- postupy izolácie a uchovávaní tkanív;
- metódy izolácie genómovej DNA hlodavcov, získavania preneseného génu z genómovej DNA a prenášania transgéennej DNA na bakteriálneho hostiteľa;
- zdroj a čísla dávok všetkých buniek, súprav a reagentov (v náležitých prípadoch);
- metódy vyčísl'ovania mutácií;
- metódy molekulárnej analýzy mutácií a použitie pri korekcii o klonalitu a/alebo metódy výpočtu frekvencie mutácií, ak sa uplatňujú;

Výsledky:

- stav zvierat pred testovaním a počas obdobia testovania vrátane príznakov toxicity;
- váha tela a orgánov pri usmrtení;
- pre každé tkanivo/zviera počet mutácií, počet hodnotených plakov alebo kolónií, frekvencia mutácií;
- pre každé tkanivo/skupinu zvierat počet spájacích reakcií na vzorku DNA, celkový počet mutácií, stredná frekvencia mutácií, štandardná odchýlka;
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť;
- pre každé tkanivo/zviera počet nezávislých mutácií a stredná frekvencia mutácií, keď sa vykonala molekulárna analýza mutácií;
- paralelné a historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami;
- paralelné údaje o pozitívnych kontrolných skupinách (alebo o neparalelných DNA pozitívnych kontrolách);
- analytické určenia, ak sú k dispozícii (napr. koncentrácie DNA použité v spájaní, údaje o sekvenovaní DNA);
- použité štatistické analýzy a metódy;

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

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. Natl. Acad. Sci. 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. Natl. Acad. Sci. 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. Natl. Acad. Sci. 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, Paríž.
24. OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paríž.
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, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paríž.
 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.
-

Dodatok

VYMEDZENIA POJMOV

Obdobie podávania: celková doba, počas ktorej sa zvieratú podáva dávka.

Bázová zámena: typ mutácie, ktorý spôsobuje nahradenie jedného nukleotidu DNA inou bázou nukleotidov DNA.

Kapsid: bielkovinový obal, ktorý obklopuje vírusovú časticu.

Chemikália: látka alebo zmes.

Klonová expanzia: produkcia mnohých buniek z jednej (mutantnej) bunky.

Jednotka tvoriaca kolónie: miera životaschopného bakteriálneho množstva.

Konkatamer: dlhá plynulá biomolekula zložená z viacerých sériovo zapojených identických kópií.

Cos-miesto: 12-nukleotidový segment jednovláknovej DNA, ktorý existuje na obidvoch koncoch dvojvláknového genómu bakteriofágovej lambdy.

Delécia: mutácia, v rámci ktorej genóm stratí jeden alebo viaceré (postupné) nukleotidy.

Elektroporácia: aplikácia elektrických impulzov na zvýšenie priepustnosti bunkových membrán.

Endogénny gén: pôvodný gén genómu.

Extrabinominálna variácia: väčšia variabilita v opakovaných odhadoch podielu populácie, ako by sa očakávala, ak by populácia mala binominálnu distribúciu.

Mutácia posúvajúca čítací rámec: genetická mutácia spôsobená včlenením alebo deléciou viacerých nukleotidov, ktorá nie je rovnomerne deliteľná tromi v rámci sekvencie DNA, ktorá kóduje bielkovinu/peptid.

Včlenenie: pridanie jedného alebo viacerých báзовých párov nukleotidov do sekvencie DNA.

Jackpot: veľký počet mutantov, ktorí vznikli klonovou expanziou z jednej mutácie.

Veľké delécie: delécie v DNA viacerých tisíc báz (ktoré sa efektívne zistia skúškou selekcie *Spi⁻* a plazmidovou skúškou *lacZ*).

Ligácia: kovalentné spájanie dvoch koncov molekúl DNA s použitím ligázy DNA.

Mitogén: chemikália, ktorá stimuluje bunku, aby sa začala deliť, a ktorá spúšťa mitózu (t. j. delenie buniek).

Neutrálny gén: gén, ktorý nie je ovplyvnený tlakmi pozitívnej alebo negatívnej selekcie.

Spájanie: syntéza infekčných fágových častíc z preparátu fágových kapsidových a zadných bielkovín a konkataméru fágových molekúl DNA. Bežne sa používa na spájanie DNA klonovaných na lambda vektore (oddelený cos-miestami) do infekčných lambda častíc.

Účinnosť spájania: účinnosť, akou sa spájané bakteriofágy získajú v hostiteľskej baktérii.

Jednotka tvoriaca plaky (pfu): miera počtu životaschopných bakteriofágov.

Bodová mutácia: všeobecný výraz pre mutáciu, ktorá ovplyvňuje len malú sekvenciu DNA vrátane malých včlenení, delécií a báзовých zámien.

Pozitívna selekcia: metóda, ktorá umožňuje prežitie len mutantov.

Reportérový gén: gén, ktorého zmutovaný génový produkt možno ľahko zistiť.

Čas odberu vzoriek: koniec časového obdobia pred usmrtením, počas ktorého sa nepodáva chemikália a počas ktorého sa nespracované lézie DNA fixujú do stabilných mutácií.

Dvojfunkčný vektor (shuttle vektor): vektor zostavený tak, aby sa mohol množiť v dvoch rôznych hostiteľských druhoch; DNA vložená do dvojfunkčného vektora možno teda testovať alebo ju manipulovať v dvoch rôznych typoch buniek alebo dvoch rôznych organizmoch.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Transgénny: organizmus alebo týkajúci sa organizmu, ktorého genóm bol zmenený prenosom génu alebo génov z iných druhov.“

ISSN 1977-0790 (elektronické vydanie)
ISSN 1725-5147 (papierové vydanie)



Úrad pre vydávanie publikácií Európskej únie
2985 Luxemburg
LUXEMBURSKO

SK