

Ročník 1998

---

# SBÍRKA ZÁKONŮ ČESKÉ REPUBLIKY

---

Částka 88

Rozeslána dne 10. listopadu 1998

Cena Kč 104,-

---

O B S A H.

251. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látok a přípravků

---

**251****VYHLÁŠKA****Ministerstva zdravotnictví**

ze dne 16. října 1998,

**kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků**

Ministerstvo zdravotnictví stanoví podle § 4 odst. 1 písm. c) zákona č. 157/1998 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů:

**§ 1**

Tato vyhláška stanoví metody pro zjišťování nebezpečných vlastností chemických látek a chemických přípravků vysoko toxicitních, toxických, zdraví škodlivých, žírových, dráždivých, senzibilizujících, karcinogenních, mutagenních a toxicitních pro reprodukci (dále jen „toxicita chemických látek a přípravků“).<sup>1)</sup>

**§ 2**

(1) Toxicita chemických látek a přípravků se zjiš-

tuje zkouškami prováděnými metodami uvedenými v příloze této vyhlášky

(2) Ke zjišťování toxicity chemických látek a přípravků lze použít i jiné metody, pokud jsou přinejmenším stejně citlivé, přesné a reprodukovatelné jako metody uvedené v odstavci 1, přednostně však metody bez použití pokusných zvířat<sup>2)</sup> a metody doporučené Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD).<sup>3)</sup>

**§ 3**

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 1. ledna 1999.

Ministr.  
MUDr. David, CSc. v. r.

<sup>1)</sup> § 2 odst. 8 písm. f) až n) zákona č. 157/1998 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů

<sup>2)</sup> Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění zákonů č. 162/1993 Sb., č. 193/1994 Sb., č. 243/1997 Sb. a č. 30/1998 Sb.

<sup>3)</sup> Směrnice Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj pro zkoušení chemikálií. Óddíl 4 – vliv na zdraví (OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 4 – Health Effects)

Příloha k vyhlášce č. 251/1998 Sb.

## Metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

### B.1. AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (PER OS)

#### I. METODA

##### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat orálně sondou, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Zvolené dávky je možno stanovit podle výsledků orientačního testu. Registrují se pozorované účinky a uhynutí. Zvířata, která uhynou během pokusu, i zvířata, která přežijí konec pokusu, se pitvají. Tato metoda se používá především při pokusech na hladavcích.

Zvířata se závažnými a přetrávavajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit. Testované látky se nesmějí podávat v takových dávkách a takovým způsobem, o kterých je známo, že vyvolávají značnou bolest a stres následkem svých leptavých nebo dráždivých vlastností.

##### 1.2 Popis metody

###### 1.2.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin.

Pokud je třeba, připraví se roztok nebo suspenze testované látky ve vhodném vehikulu. Doporučuje se jako první uvážit použití vodného roztoku, další volbou je roztok v rostlinném oleji, teprve potom jako další možnost roztok v jiných vhodných vehikulích nebo suspenze. U nevodných vehikulů musí být známy nebo určeny před testem nebo během něho jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hladavců by objem neměl normálně překročit  $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti; výjimkou jsou vodné roztoky, jichž je možno podávat až  $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Variabilita objemů látky podávané v testech by se měla minimalizovat takovou úpravou koncentrací, aby se zajistil konstantní objem na všech hladinách dávek. Současně je třeba zvolit vhodnou koncentraci látky ve vehikulu tak, aby bylo minimalizováno lokální dráždivé působení.

###### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu. Je třeba používat mladých zdravých zvířat z běžně užívaných pokusných kmenů. Na začátku

testu by u obou pohlaví nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty.

#### 1.2.2.2 Počet a pohlavi

Pro každou hladinu dávek použít nejméně 5 hlodavců stejného pohlaví. Používá-li se samic, musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud je k dispozici informace, že jedno z obou pohlaví je výrazně citlivější, je třeba používat zvířata tohoto pohlaví.

*Poznámka:* Používají-li se v akutních testech toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, mělo by se zvážit použití menšího počtu zvířat. Dávky je třeba pečlivě zvolit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxické dávky. V takových testech je třeba se vyvarovat podání letálních dávek testované látky.

#### 1.2.2.3 Volba dávek

Má být dostatečný počet hladin dávek, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány tak, aby byl u testovacích skupin viditelný rozsah toxických účinků a mortality. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a účinkem, a pokud je to možné, musí umožnit stanovení LD<sub>50</sub> s přijatelnou spolehlivostí.

#### 1.2.2.4 Limitní test

S použitím hlodavců lze provést limitní test jednou dávkou nejméně 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti na skupinách 5 samců a 5 samic s použitím výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

#### 1.2.2.5 Doba pozorování

Doba pozorování by měla činit nejméně 14 dní. Nelze ji však stanovit rigorózně. Měla by být určena podle obrazu otravy, rychlosti vývoje otravy a trvání fáze zotavení. Dobu pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Důležitá je doba, kdy se projevy otravy objeví a vymizí, a doba do uhynutí, zvláště tam, kde je patrná tendence k zpožděné mortalitě.

#### 1.2.3 Popis postupu

Před podáním testované látky mají být zvířata hladová. Potkanům se potrava odeberete večer před testem. U zvířat s vyšší rychlostí látkové výměny postačí kratší hladovění; přístup k pitné vodě není omezen. V den pokusu se zvířata zváží a testovaná látka se podá sondou orálně v jedné dávce. Není-li možno podat dávku najednou, lze podat aplikovanou dávku po menších množstvích během nejvýše 24 hodin. Po podání dávky je třeba zamezit přístup k potravě ještě 3 - 4 hodiny. Podává-li se látka frakcionovaně během určitého období, může být žádoucí - podle délky tohoto období - potravu a vodu zvířatům poskytnout.

Po podání látky se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky, pro každé zvíře se vedou samostatné záznamy. Během prvního dne je třeba provádět častá pozorování. Je nezbytné sledovat a zaznamenat místní účinek aplikované látky a bezprostřední reakci zvířat na aplikaci.

Nejméně jednou během každého pracovního dne je třeba provádět pečlivá klinická vyšetření. Jiná pozorování se provádějí denně s vhodnými opatřeniami k minimalizaci ztrát zvířat pro studii, např. pitva nebo zmrazení uhynulých zvířat, a izolace či usmrcení slabých nebo umírajících zvířat. Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečovým jevům, slinění, průjmu, letargii, spánku a komatu. Okamžik uhynutí je třeba zaznamenat co nejpřesněji.

Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežije až do konce pokusu, se pitvají. Všechny patologické nálezy se zaznamenají. Je-li to indikováno, odeberou se tkáně pro histologické vyšetření.

#### 1.2.4 Hodnocení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení pokusu na jednom pohlaví, podá se látka nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda zvířata druhého pohlaví nejsou výrazně citlivější na testovanou látku. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata testovaného pohlaví jsou výrazně citlivější, testování na zvířatech druhého pohlaví je možno vynechat.

### 2. ÚDAJE

Údaje se sestavují do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými projevy otravy, popis toxicických účinků a pitevních nálezů. Stanovení hmotnosti jednotlivých zvířat se provede bezprostředně před podáním testované látky, pak v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na stres a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané touto látkou. LD<sub>50</sub> se vypočte uznávanou metodou. Vyhodnocení údajů by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat testované látce a výskytem a stupněm všech abnormalit včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézi, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxicických účinků.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, potrava atd.,
- experimentální podmínky,
- úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- pohlaví zvířat,
- tabelárně údaje o odpovídích podle pohlaví a podle hladiny dávek (počet uhynulých zvířat, počet zvířat s projevy otravy, počet exponovaných zvířat),

- doba uhynutí po podání testované látky, důvody a kriteria pro humánní utracení zvířat - všechna jiná pozorování,
  - hodnota LD<sub>50</sub> pro to pohlaví, u kterého byl proveden úplný pokus, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody výpočtu),
  - 95 %-ní meze spolehlivosti pro LD<sub>50</sub>, pokud je lze vypočítat,
  - křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice, (pokud je stanovení danou metodou možné),
  - pitevní nálezy,
  - všechny histopatologické nálezy,
- výsledky všech testů na druhém pohlaví,
- rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat účinku, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během testu na vypočtenou hodnotu LD<sub>50</sub>),
  - interpretace výsledků.

## B.1.bis AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (PER OS) - METODA FIXNÍ DÁVKY

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Test akutní orální toxicity poskytuje informace o nepříznivých účincích, které mohou následovat během krátké doby po orálním podání jedné dávky testované látky.

Metoda s fixní dávkou se provádí ve dvou etapách.

V předběžné orientační studii se sekvenčním způsobem sledují účinky několika dávek při orální aplikaci sondou u zvířat téhož pohlaví, vždy jedno zvíře na dávku. Orientační studie poskytuje informaci o vztahu dávky a toxicity, včetně odhadu minimální letální dávky. Normálně se v této první etapě nepoužije více než pět zvířat.

V hlavní studii se látka podává orálně sondou skupinám pěti samců a pěti samic v jedné z těchto fixních dávek: 5, 50, 500 nebo 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti. Použitá dávka se odvodi z předběžné orientační studie, a to jako dávka, která pravděpodobně vyvolá "zřejmou toxicitu" (viz část B - Všeobecný úvod bod 1.2), ale ne uhynutí.

Po podání se pozorují účinky. Jestliže vybraná výchozí úroveň dávky vyvolá zřejmou toxicitu, ale žádnou mortalitu, není třeba žádat další testování. Když na zvolené úrovni dávky není pozorována zřejmá toxicita, látka se znova otestuje na nejbližší vyšší úrovni dávky. Pokud zvířata uhynou nebo když závažná toxická reakce vyžaduje humánní utracení, látka se znova otestuje na nejbližší nižší úrovni dávky.

Tento postup umožňuje zjistit "diskriminující dávku" (viz část B - Všeobecný úvod bod 1.2), tj. nejvyšší z předem stanovených úrovní dávky, kterou je možno podat aniž by došlo k úhynu (včetně případů humánního utracení).

Zvířata se závažnými a přetrávavajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit. Testované látky se nesmějí podávat v takových dávkách a takovým způsobem, o kterých je známo, že vyvolávají značnou bolest a stres následkem svých leptavých nebo dráždivých vlastností.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

###### 1.2.1.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu.

Je třeba používat běžně užívané kmeny pokusných zvířat. Na začátku testu by u obou pohlaví nemělo variacioní rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % střední hodnoty.

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin orientační studie a hlavní studie. Běžně stačí pro hlavní studii jedna skupina každého z obou pohlaví.

### 1.2.1.2 *Příprava a podávání dávky*

Pokud je třeba, připraví se roztok nebo suspenze testované látky ve vhodném vehikulu. Doporučuje se jako první uvážit použití vodného roztoku, další volbou je roztok v rostlinném oleji, teprve potom jako další možnost roztok v jiných vhodných vehikulích nebo suspenze. U nevodných vehikulů musí být známy nebo určeny před testem nebo během něho jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by objem neměl normálně překročit  $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti; výjimkou jsou vodné roztoky, jichž je možno podávat až  $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Variabilita objemů látky podávané v testech by se měla minimalizovat takovou úpravou koncentrací, aby se zajistil konstantní objem na všech hladinách dávek.

Před podáním testované látky mají být zvířata hladová. Potkanům se potrava odebere večer před testem; přístup k pitné vodě není omezen. V den pokusu se zvířata zváží a testovaná látka se podá sondou orálně v jediné dávce. Není-li možno podat dávku najednou, lze podat aplikovanou dávku po menších množstvích během nejvýše 24 hodin. Po podání dávky je třeba zamezit přístup k potravě ještě 3 - 4 hodiny. Podává-li se látka frakcionovaně během určitého období, může být žádoucí - podle délky tohoto období - potravu a vodu zvířatům poskytnout.

### 1.2.2 *Popis postupu*

#### 1.2.2.1 *Orientační studie*

Vyšetřuje se účinky různých dávek na jednotlivá zvířata. Normálně se používají samice, pokud nejsou k dispozici údaje, že jsou samci citlivějším pohlavím. Dávky se podávají sekvenčně, čeká se alespoň 24 hodin před podáním dávky dalšímu zvířeti. Všechna zvířata se pečlivě pozorují s cílem zjistit projevy otravy nejméně po sedm dnech; pokud přetrhávají projevy mírné otravy sedmý den, zvíře se musí pozorovat ještě po dalších sedm dnech. Posuzují se následující výchozí hladiny dávek: 5, 50, 500 a  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Jestliže zvolená výchozí dávka nevyvolá těžkou otravu a přitom nejbližší vyšší vyvolá uhynutí, potom je nutné podat podle potřeby jednu nebo více vmezenečných úrovní dávek. Tento způsob by měl poskytnout informace o úrovni(ich) dávek, která(é) vyvolává(vají) příznaky otravy a o nejmenší dávce, která vyvolává mortalitu.

Je třeba pokusit se vybrat výchozí dávku podle údajů o příbuzných chemických látkách. Pokud nejsou k dispozici, doporučuje se použít jako první dávky  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Jestliže se po výchozí dávce nepozorují příznaky otravy, vyšetřuje se další vyšší úroveň dávky. Jestliže nedojde k uhynutí při  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , je orientační studie skončena a hlavní studii je třeba provést na této úrovni dávky. Jestliže jsou při použití výchozí dávky (např.  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) zjištěny těžké účinky, vyžadující humánní utracení, je podána dalšímu zvířeti nejbližší nižší dávka (např.  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Jestliže toto zvíře přežívá, mohou být použity pro další zvířata vhodné dávky mezi určenými fixními dávkami. Za normálních podminek se neočekává, že je při tomto postupu zapotřebí více než 5 zvířat.

### 1.2.2.2 Hlavní studie

Pro každou vyšetřovanou dávkovou hladinu by se mělo použít nejméně 10 zvířat (5 samic a 5 samců). Samice by měly být nullipary a neměly by být březí.

Principem metody fixní dávky je použití pouze mírně toxicických dávek pro hlavní studii. Je třeba se vyhnout podávání letálních dávek testované látky.

Dávka, která bude užita v testu, má být zvolena z jedné ze 4 fixních úrovní dávek, jmenovitě 5, 50, 500 nebo  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Zvolená výchozí úroveň dávky by měla být ta, která pravděpodobně vyvolá zřejmou toxicitu, avšak nikoliv mortalitu (včetně utracení z humánních důvodů); náhodná uhynutí nejsou zahrnuta, ale mají být zaznamenána. Jestliže tato dávka vyvolá zřejmou toxicitu, ale nevyvolá mortalitu, není zapotřebí dalšího testování.

Když podání zvolené dávky nevyvolá zřejmou toxicitu, je nutné látku znova testovat na další vyšší úroveň dávek. Zvířata by však měla být dále pozorována tak, aby pozorovací období bylo kompletní. Jestliže těžká toxicická odpověď vyžaduje humánní utracení zvířat nebo když se projeví mortalita vlivem látky, měla by být látna znova testována na další nižší úrovni dávek. Opět ta zvířata, která není nutné humánně utratit, by měla být pozorována po celé pozorovací období.

Po podání látky se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky. Pro každé zvíře se vedou samostatné záznamy. Je nezbytné sledovat a zaznamenat místní účinek aplikované látky a bezprostřední reakci zvířat na aplikaci.

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Nelze ji však stanovit rigorozně. Měla by být určena podle obrazu otravy, rychlosti vývoje otravy a trvání fáze zotavení. Dobu pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Důležitá je doba, kdy se projevy otravy projeví a vymizí a doba do uhynutí, zvláště tam, kde je patrná tendence k pozdnímu vzniku toxicických příznaků.

Pečlivá klinická vyšetření je třeba provádět nejméně dvakrát první den po podání látky a nejméně jedenkrát za den další dny. Zvířata vykazující patrné známky bolesti nebo výrazné příznaky stresu je třeba humánně utratit. Častější pozorování jsou prováděna během několika prvních dní po podání látky, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Test může být ukončen v případě, když je zřejmé, že byla zvolena příliš vysoká dávka.

Pozorování se zaměřuje na změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečovým jevům, slinění, průjmu, letargii, spánku a komatu.

Stanovení hmotnosti jednotlivých zvířat se provede bezprostředně před podáním testované látky, denně po další 3 dny a potom jednou týdně. Zvířata, která uhynou během testu, i ta, která přežívají do konce testu, se zváží a pitvají. Všechny makroskopické patologické změny se zaznamenávají. Je-li to indikováno, odeberou se tkáně pro histopatologické vyšetření.

V závislosti na účincích předcházející úrovně dávky může být zapotřebí vyšetření druhé nebo výjimečné třetí hladiny dávky.

V případě, že látka vyvolává mortalitu při dávce  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (nebo jestliže orientační studie naznačuje mortalitu při této dávce), je třeba dále vyšetřovat akutní toxicitu testované látky.

## 2. ÚDAJE

Údaje z orientační i hlavní studie se sestavují do tabulky jednotlivě pro každou testovanou úroveň dávky. Z ní musí být patrný počet zvířat na počátku pokusu; počet zvířat s příznaky toxicity; počet zvířat uhynulých během testu nebo utracených z humánních důvodů; popis toxicických účinků; pro hlavní studii, zda byl pozorován zřejmý toxicický účinek, který lze připsat testované látce; časový průběh všech toxicických účinků; výsledky pitvy. V případě, že zvířata přežívají déle než den, je třeba vypočítat a zaznamenat změny hmotnosti.

Zvířata, která jsou humánně utracena vzhledem ke stresu nebo bolestem vyvolaným testovanou látkou, jsou zaznamenána jako uhynutí vyvolaná testovanou látkou.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace pro orientační i hlavní studii:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky ustájení, krmení, atd.,
- experimentální podmínky,
- úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- kompletní výsledky všech vyšetřovaných úrovní dávek,
- ve formě tabulky údaje o odpovědích podle pohlaví a podle úrovní dávek (počet použitých zvířat; změny tělesné hmotnosti; případně počet uhynulých zvířat nebo zvířat utracených během testu; počet zvířat s příznaky toxicity; povaha, stupeň a trvání účinků),
- časový průběh nástupu toxicických příznaků a zda byly reversibilní,
- pokud zvířata uhynula nebo byla utracena, doba úhynu po podání látky, důvody a kriteria použitá pro indikaci humánního utracení zvířat,
- pitevní nálezy,
- všechny histopatologické nálezy,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků, včetně příznaků zřejmé toxicity a diskriminující dávkové hladiny zjištěné v testu

### 3.2 Hodnocení a interpretace

Dávka	Výsledky	Interpretace
5 mg.kg <sup>-1</sup> tělesné hmotnosti	Méně než 100% přežití 100% přežití, ale zřejmá toxicita 100% přežití; není zřejmá toxicita	Látky, které jsou <i>velmi jedovaté</i> Látky, které jsou <i>jedovaté</i> Viz výsledky při 50 mg.kg <sup>-1</sup>
50 mg.kg <sup>-1</sup> tělesné hmotnosti	Méně než 100% přežití 100% přežití, ale zřejmá toxicita 100% přežití; není zřejmá toxicita	Látky, které mohou být <i>jedovaté nebo velmi jedovaté</i> . Viz výsledky při 5 mg.kg <sup>-1</sup> Látky, které jsou <i>zdraví škodlivé</i> Viz výsledky u 500 mg.kg <sup>-1</sup>
500 mg.kg <sup>-1</sup> tělesné hmotnosti	Méně než 100% přežití 100% přežití, ale zřejmá toxicita 100% přežití; není zřejmá toxicita	Látky, které mohou být <i>jedovaté nebo zdraví škodlivé</i> . Viz výsledky u 50 mg.kg <sup>-1</sup> Látky, které lze považovat za látky bez významné akutní toxicity Viz výsledky u 2000 mg.kg <sup>-1</sup>
2000 mg.kg <sup>-1</sup> tělesné hmotnosti	Meně než 100% přežití 100% přežití s nebo bez zřejmě toxicity	Viz výsledky u 500 mg.kg <sup>-1</sup> Látky, které nemají významnou akutní toxicitu

## B.1 tris AKUTNÍ TOXICITA (ORÁLNÍ) - METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

### 1. METODA

#### 1.1 Úvod

Metoda stanovení třídy akutní toxicity poskytuje informace jak pro posuzování rizika, tak pro účely klasifikace rizika.

Metoda používá tři pevně stanovených dávek v přiměřených odstupech, tak aby bylo možno testovanou látku na základě výsledků zařadit. Kromě toho postup popsáný pro tuto testovací metodu umožnuje výběr tří doplňkových pevně stanovených dávek, které lze použít buď jako alternativní dávky pro určité body rozhodovacího procesu, nebo pro další testování. Použití některé z těchto doplňkových dávek je možno uvážit, pokud je žádoucí nebo nezbytné další zpřesnění.

Metoda používá pevně stanovené počáteční dávky a není určena pro výpočet přesné LD<sub>50</sub>. Umožnuje stanovení rozsahu expozic, ve kterém se očekává úmrtnost, protože smrt části zvířat je i u této metody hlavním kritériem účinku. Výsledky testu mají umožnit klasifikaci látky. Vzhledem k sekvenčnímu postupu by trvání testu mohlo být delší než postup popsáný v metodě B.1. Hlavní výhodou této metody je menší spotřeba zvířat než u metody akutní toxicity (orální) (B.1) i než u alternativní metody fixní dávky (B.1 bis).

#### 1.2 Princip testovací metody

Látka se podává orálně skupině pokusných zvířat v jedné ze stanovených dávek. Testování se provádí postupně, v každém kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví. Není nutné provádět předběžnou studii. Přítomnost nebo nepřítomnost úhynu zvířat ve vztahu k podávané látce rozhodne o dalším kroku, t.j.

- není zapotřebí žádné další testování;
- další krok bude proveden se stejnou dávkou, ale se zvířaty druhého pohlaví;
- další krok bude proveden s vyšší nebo nižší úrovní dávky.

#### 1.3 Popis metody

##### 1.3.1 Příprava

Zdravá mladá dospělá zvířata jsou náhodně vybrána, označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých zvířat, a chována ve svých klecích nejméně 5 dnů před zahájením testu, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky. Zvířata mohou být v klecích ve skupinách podle pohlaví a dávky, ale počet zvířat v jedné kleci musí umožnit jasné pozorování každého zvířete.

Testovaná látka je aplikována zvířatům v jediné dávce žaludeční sondou nebo vhodnou kanylou.

Pokud je to třeba, testovaná látka se rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze, pak použití roztoku/emulze v jedlém rostinném oleji (např. kukuřičném) a pak roztoku v jiných nosičích. Pro nevodná vehikula musí být známa jejich toxicální charakteristika; pokud není známa, musí být stanovena ještě před testem.

Zvířata jsou před aplikováním látky po určitou dobu bez potravy (např. potkaní přes noc a myši 3 - 4 hodiny); přístup k vodě se neomezuje.

### 1.3.2 Experimentální podmínky

#### 1.3.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu. Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Na začátku studie by nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty.

#### 1.3.2.2 Počet a pohlavi

Pro každý krok se používají tři zvířata jednoho pohlaví. V úvodním kroku může být použito kterékoli pohlaví.

#### 1.3.2.3 Úrovně dávek

Výchozí dávková úroveň je vybrána ze tří pevných úrovní, t. zn. 25, 200 a 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti. Výchozí úroveň dávky by měla být taková, aby s největší pravděpodobností způsobila uhynutí alespoň některých zvířat, jimž byla látka podána. V závislosti na výchozí dávce se použije příslušného diagramu postupu popsaného v Dodatku 1.

Pro výběr pohlaví a výchozí dávky je třeba využít veškeré dostupné informace, včetně informací o vztahu struktury a účinku. Pokud tyto informace naznačují, že úmrtnost je nepravděpodobná i při nejvyšší úrovni dávky (2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti), pak se provede limitní test. Kde nejsou žádné informace o testované látce, doporučuje se - s ohledem na pokusná zvířata - použít výchozí dávku 200 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti.

V některých případech je třeba dále zpřesnit získanou informaci, než jak to dovoluje test s třemi pevnými dávkovými úrovněmi ve výši 25, 200 a 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti. V těchto případech se může uvažovat o dalším testování při doplňkových pevných dávkách ve výši 5, 50 nebo 500 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti.

Nemají se aplikovat dávky, o kterých je známo, že způsobují svými leptavými nebo těžce dráždícími účinky značnou bolest a stres.

Časový interval mezi aplikacemi skupinami je závislý na rychlosti nástupu, na trvání a závažnosti toxicických příznaků. Testování na zvířatech druhého pohlaví nebo při další dávce je třeba odložit, dokud není jisté, že zvířata předchozí dávku přežila.

#### 1.3.2.4 Limitní test

- Limitní test s jedinou úrovní dávky ve výši  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti se provádí na třech zvířatech každého pohlaví. Pokud dojde k uhynutí souvisejícím s podáním látky, lze další testování provést při dávkách  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (nebo 500  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) tělesné hmotnosti.

#### 1.3.2.5 Doba pozorování

Přežívající zvířata je třeba pozorovat obvykle po dobu 14 dnů, kromě případů, kdy musí být zvířata vyloučena z dalšího pozorování a humánně utracena z důvodů ochrany zvířat. Trvání pozorování by však nemělo být stanoveno předem pevně; může být prodlouženo podle toxicických reakcí, aby jejich nástupu a délky zotavovacího období. Je důležité zaznamenávat dobu, kdy se objeví a mizí příznaky toxicity, zvláště jde-li o zpožděné toxicke příznaky. Veškerá pozorování jsou systematicky zaznamenávána: záznamy jsou vedeny pro každé jednotlivé zvíře.

#### 1.3.3 Popis postupu

Po období hladovění jsou zvířata před podáním zkusební látky zvážena. Po aplikaci látky jsou zvířata bez potravy po dobu dalších 3 - 4 hodin. Kde je dávka podávána po částech během určité doby, může být - v závislosti na délce této doby - nezbytné poskytnout zvířatům potravu i vodu.

Maximální objem tekutiny, který může být podán najednou, závisí na velikosti zvířete. U hlodavců by objem neměl normálně přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, v případě vodních roztoků lze podat i 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. Rozdíly v podávaném objemu je třeba minimalizovat upravením koncentrace tak, aby byl podáván týž objem na všech úrovních dávky. Jestliže není možné podat dávku celou najednou, je možné ji aplikovat po částech po dobu nepřekračující 24 hodin.

Podrobnosti postupu testování jsou popsány v Dodatku 1.

#### 1.3.3.1 Všeobecné pozorování

Pečlivé klinické pozorování se provádí dvakrát za první den (den aplikace) nebo častěji, pokud to vyžaduje reakce zvířat na podání látky, a dále nejméně jednou denně. Zvířata, která jsou nalezena v agonálním stavu, nebo zvířata vykazující příznaky silné bolesti a přetrávajícího silného stresu, je třeba humánně utratit. tato zvířata jsou hodnocena stejně jako zvířata uhynulá.

- Ať už byla zvířata utracena z humánních důvodů nebo byla nalezena mrtvá, dobu smrti je třeba zaznamenat co nejpřesněji. Další pozorování se provádí, dokud zvířata vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnuje změny na kůži a srsti, na očích a sliznicích, a také na dýchacím, oběhovém, vegetativním a centrálním nervovém systému, motorické aktivitě a chování. Pozornost je třeba věnovat výskytu třesu, křečí, slinění, průjmu, letargie, spánku a kómatu.

Veškerá pozorování jsou systematicky zaznamenávána: záznamy jsou vedeny pro každé jednotlivé zvíře.

### 1.3.3.2 *Tělesná hmotnost*

Všechna zvířata jsou zvážena krátce před podáním testované látky a pak nejméně jednou týdně. Počítají se a zaznamenávají změny hmotnosti. Na konci testu jsou přežívající zvířata zvážena před tím, než budou humánně utracena.

### 1.3.3.3 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii, včetně uhynulých a utracených během testu, se provede pitva. Všechny makroskopické patologické změny jsou zaznamenány pro každé zvíře zvlášť. Pro získání dalších užitečných informací je možno uvážit mikroskopické vyšetření orgánů vykazujících známky makroskopické patologie u zvířat přežívajících 24 a více hodin.

## 2. SBĚR A ZÁZNAM ÚDAJŮ

K dispozici musí být údaje o každém jednotlivém zvířeti. Navíc jsou všechny údaje shrnutы do tabulkové formy, uvádějící u každé testované skupiny počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu testu nebo utracených z humánních důvodů, dobu úmrtí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků, a pitevní nálezy.

Všeobecné poučení o interpretaci výsledků pro klasifikaci je uvedeno v Dodatku 2.

## 3. ZÁVĚRČNÁ ZPRÁVA

### **Zpráva o průběhu pokusu**

Zpráva o pokusu obsahuje tyto informace, pokud mohly být získány :

#### *Pokusná zvířata:*

- živočišný druh/kmen;
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám;
- počet, stáří a pohlaví zvířat;
- zdroj, podmínky chovu, potrava atd.;
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku testu, dále v týdenních intervalech a na konci testu.

#### *Podmínky testování.*

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud je jiné než voda;
- podrobné údaje o způsobu aplikace testované látky včetně podávaných objemů a doby aplikace;
- podrobné údaje o potravě a kvalitě vody (včetně druhu a zdroje);
- zdůvodnění výběru počateční dávky.

#### *Výsledky:*

- sestavení údajů o reakcích každého zvířete do tabulek podle pohlaví a dávkové úrovně (t. zn. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně úmrtí, charakter, závažnost a trvání účinků);
- nástup a časový průběh příznaků toxicity a jejich reverzibilita u každého zvířete;

— pitevní nálezy a histopatologické nálezy u každého zvířete, jsou-li dispozici.

*Diskuse výsledků:*

*Hodnocení a interpretace:*

4. LITERATURA

Tato metoda je analogická s metodou OECD TG 423.

**DODATEK 1****POSTUP TESTOVÁNÍ**

1. Jak bylo uvedeno v bodu 1.4.2.3, výchozí dávka by měla být ta ze tří pevně stanovených dávkových úrovní, která pravděpodobně způsobi uhynutí aspoň u některých zvířat. Pro výběr výchozí dávky lze použít následující informace:
  - údaje o fyzikálně-chemických vlastnostech,
  - vztah struktury a účinku,
  - všechny údaje z jiných testů toxicity a
  - předpokládané použití testované látky.
2. Příslušné vývojové diagramy uvedené v tomto dodatku stanovují postup pro každou výchozí dávku. V závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat postupuje testování tak, jak naznačují šipky.
3. Pokud po aplikaci výchozí dávky 25 nebo 200 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti uhyne pouze jedno zvíře druhého pohlaví, obvykle se již dále netestuje. Pókud však přitom nejsou u ostatních 5 zvířat žádné toxicke příznaky, je třeba pitvou ověřit možnost, že úmrtí nesouviselo s podánou látkou. Jestliže se tato možnost potvrdí, je třeba pokračovat v testování na vyšší úrovni dávky.
4. Pokud po dávce 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti uhyne jedno zvíře každého pohlaví, dá se předpokládat, že hodnota LD<sub>50</sub> překročí dávku 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti. Protože je to však jen hraniční výsledek, je třeba pečlivě posoudit reakce zbývajících dvou zvířat každého pohlaví: zřetelné, výrazné toxicke příznaky u těchto zvířat mohou být důvodem pro klasifikaci odpovídající hodnotě LD<sub>50</sub> ve výši 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti nebo menší, nebo mohou být podnětem pro další testování na stejně úrovni dávky.
5. Postup umožňuje testování s třemi doplňkovými pevně stanovenými dávkami (varianta 2). Této varianty je možno použít buď k výběru alternativní dávky v daném bodu rozhodovacím procesu, nebo pro další testování po dokončení testování podle varianty 1.

**Postup testování s výchozí dávkou 25 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti**

V rámečcích je udána dávka, počet zvířat a pohlaví (1 - pohlaví zvolené jako první, 2 - pohlaví zvolené jako druhé).

Pod rámečky je počet uhynulých nebo utracených zvířat (0, 1, 2, 3). Podle počtu uhynulých zvířat se v testování pokračuje ve směru šipek až do dosažení šedého rámečku.

**Varianta 1** - Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku nebo podle způsobu vyhodnocení uvedeného v Dodatku 2.

**Varianta 2** - Pokračování testu s příslušnou doplňkovou dávkou.

Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku.

**Postup testování s výchozí dávkou 200 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti**

V rámečcích je udána dávka, počet zvířat a pohlaví (1 - pohlaví zvolené jako první, 2 - pohlaví zvolené jako druhé).

Pod rámečky je počet uhynulých nebo utracených zvířat (0, 1, 2, 3). Podle počtu uhynulých zvířat se v testování pokračuje ve směru šipek až do dosažení šedého rámečku.

**Varianta 1** - Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku nebo podle způsobu vyhodnocení uvedeného v Dodatku 2.

**Varianta 2** - Pokračování testu s příslušnou doplňkovou dávkou.

Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku.

**Postup testování s výchozí dávkou 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti**

V rámečcích je udána dávka, počet zvířat a pohlaví (1 - pohlaví zvolené jako první, 2 - pohlaví zvolené jako druhé).

Pod rámečky je počet uhynulých nebo utracených zvířat (0, 1, 2, 3). Podle počtu uhynulých zvířat se v testování pokračuje ve směru šipek až do dosažení šedého rámečku.

**Varianta 1** - Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku nebo podle způsobu vyhodnocení uvedeného v Dodatku 2.

**Varianta 2** - Pokračování testu s příslušnou doplňkovou dávkou.

Ukončení testu: Klasifikace se provede na základě konečných hodnot uvedených v příslušném šedém rámečku.

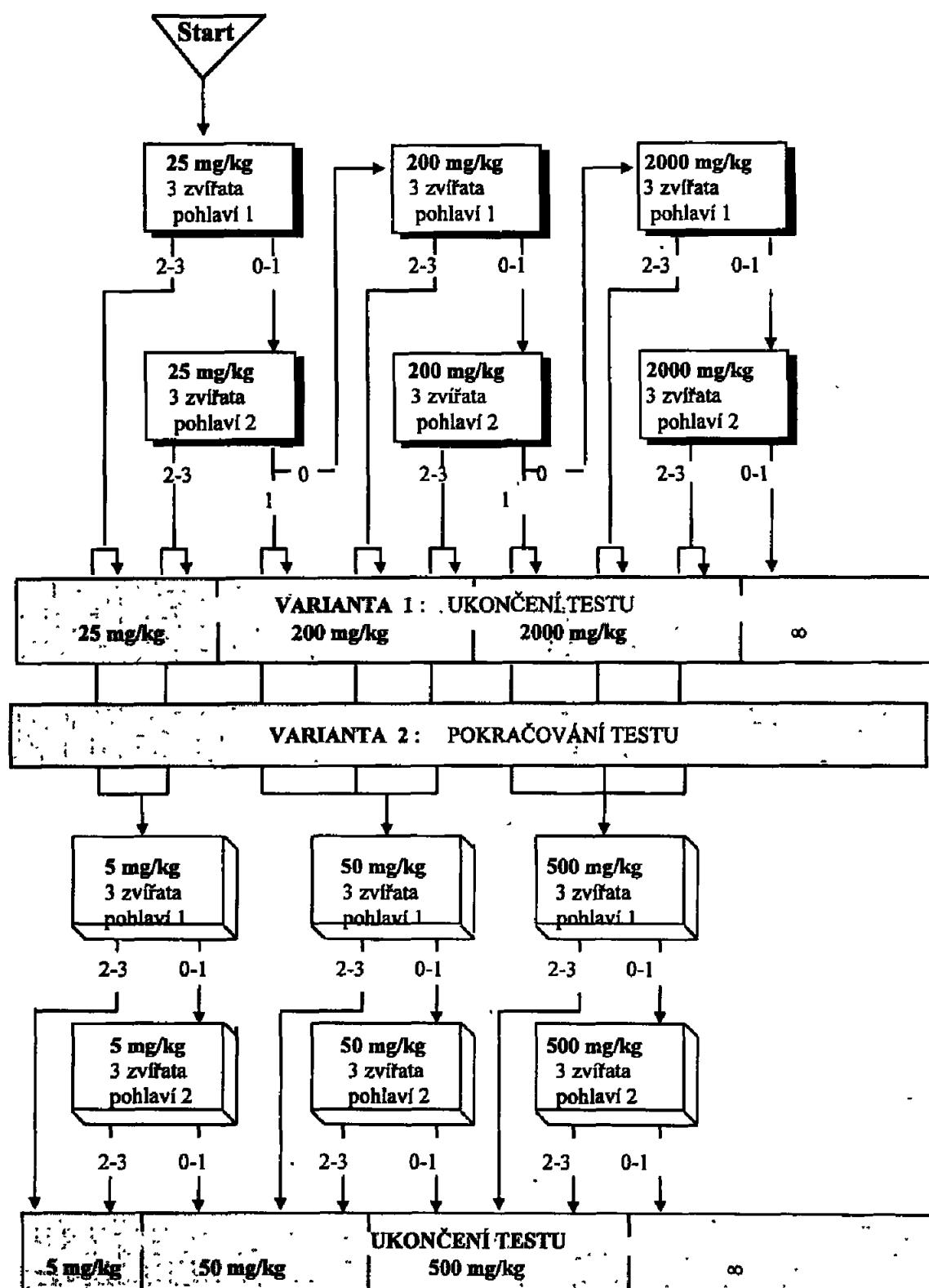
**DODATEK 2****Interpretace výsledků zařazených na testovací variantě 1**

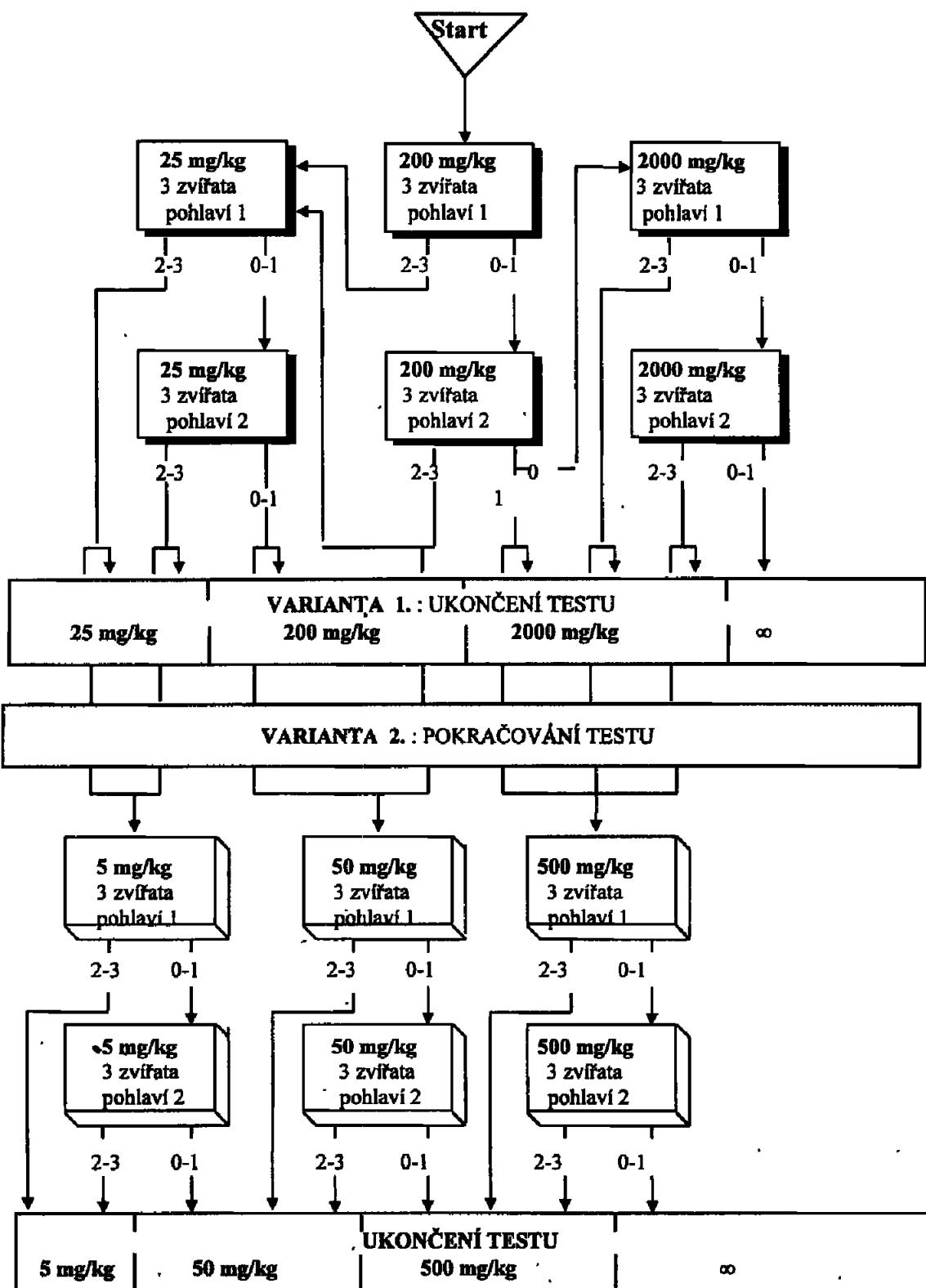
V rámečcích je udána dávka, počet zvířat a pohlaví (1 - pohlaví zvolené jako první, 2 - pohlaví zvolené jako druhé).

Pod rámečky je počet uhynulých nebo utracených zvířat (0, 1, 2, 3).

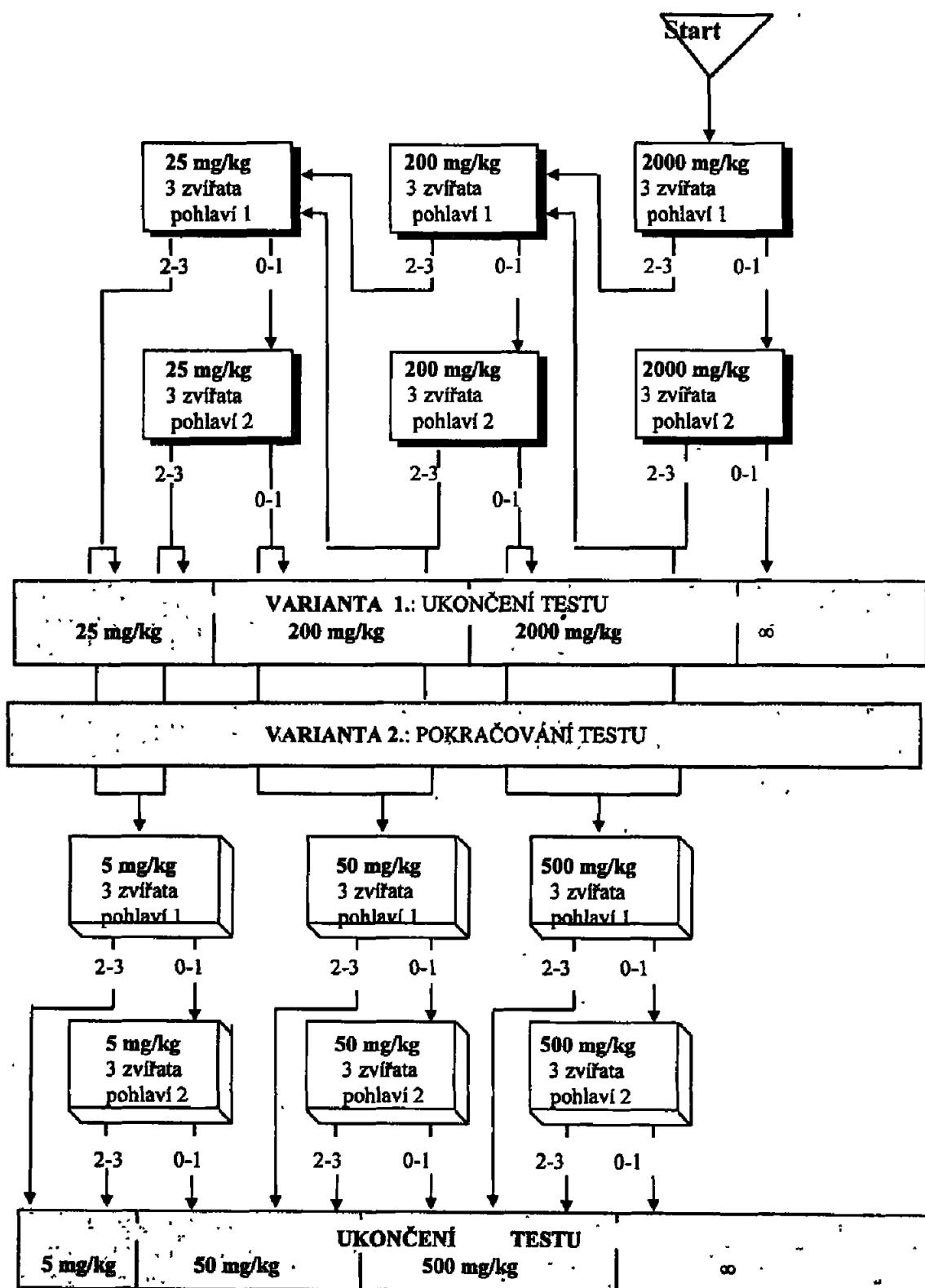
Šedé rámečky pod rámečkem "ŽÁDNÉ DALŠÍ TESTOVÁNÍ" v diagramech tohoto dodatku obsahují konečné hodnoty pro klasifikaci. Po testování podle varianty 1 se příslušná šipka sleduje dokud se nedosáhne příslušného rámečku. (Hodnoty v rámečcích vyznačují horní hranice pro příslušný způsob klasifikace. Ležatá osmička znamená, že LD<sub>50</sub> je větší než hodnota v nejbližším rámečku vlevo.)

## ( a ) Testovací postup s výchozí dávkou 25 mg/kg tělesné hmotnosti



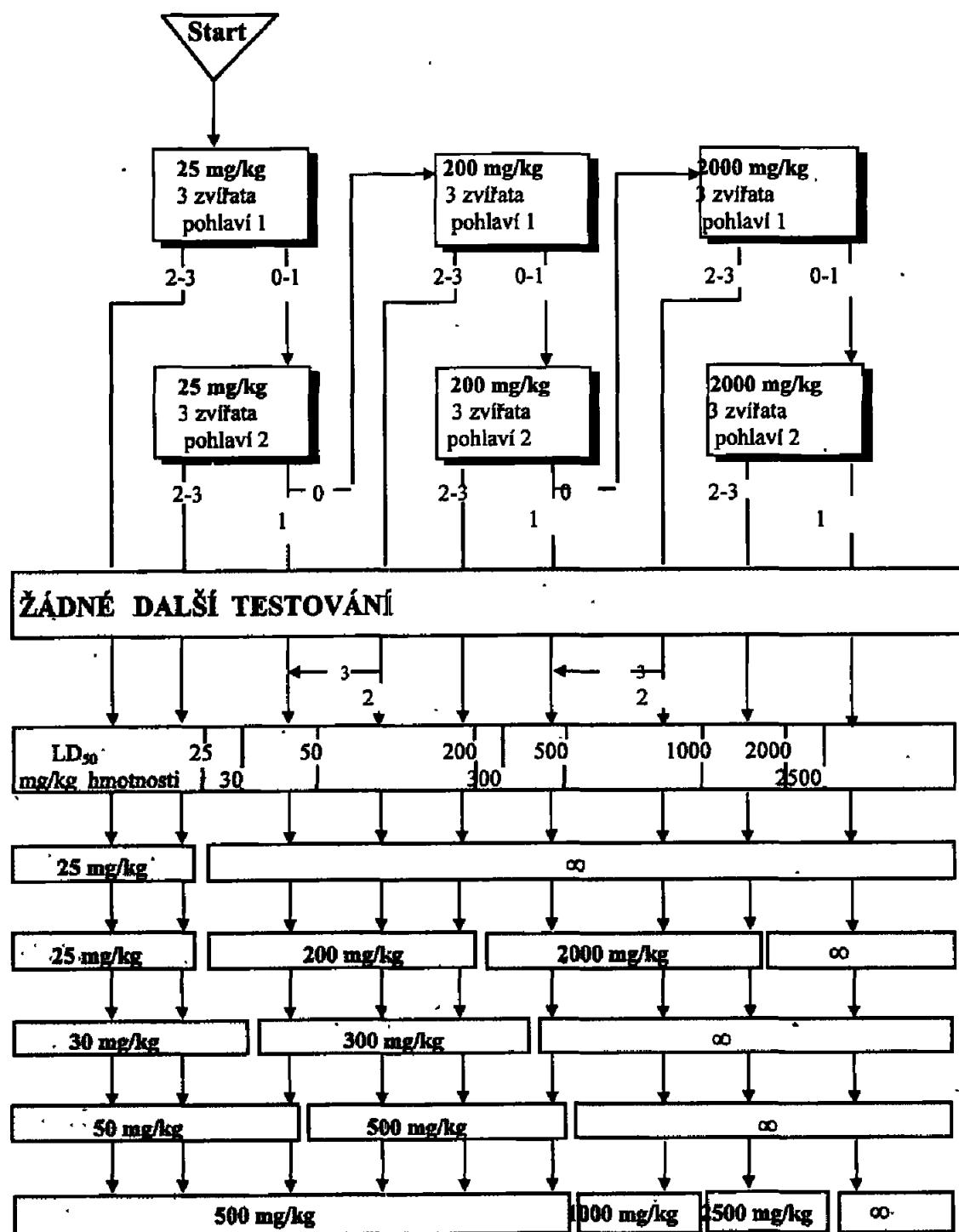
( b ) Testovací postup s výchozí dávkou 200 mg/kg tělesné hmotnosti

## (c) Testovací postup s výchozí dávkou 2000 mg/kg tělesné hmotnosti

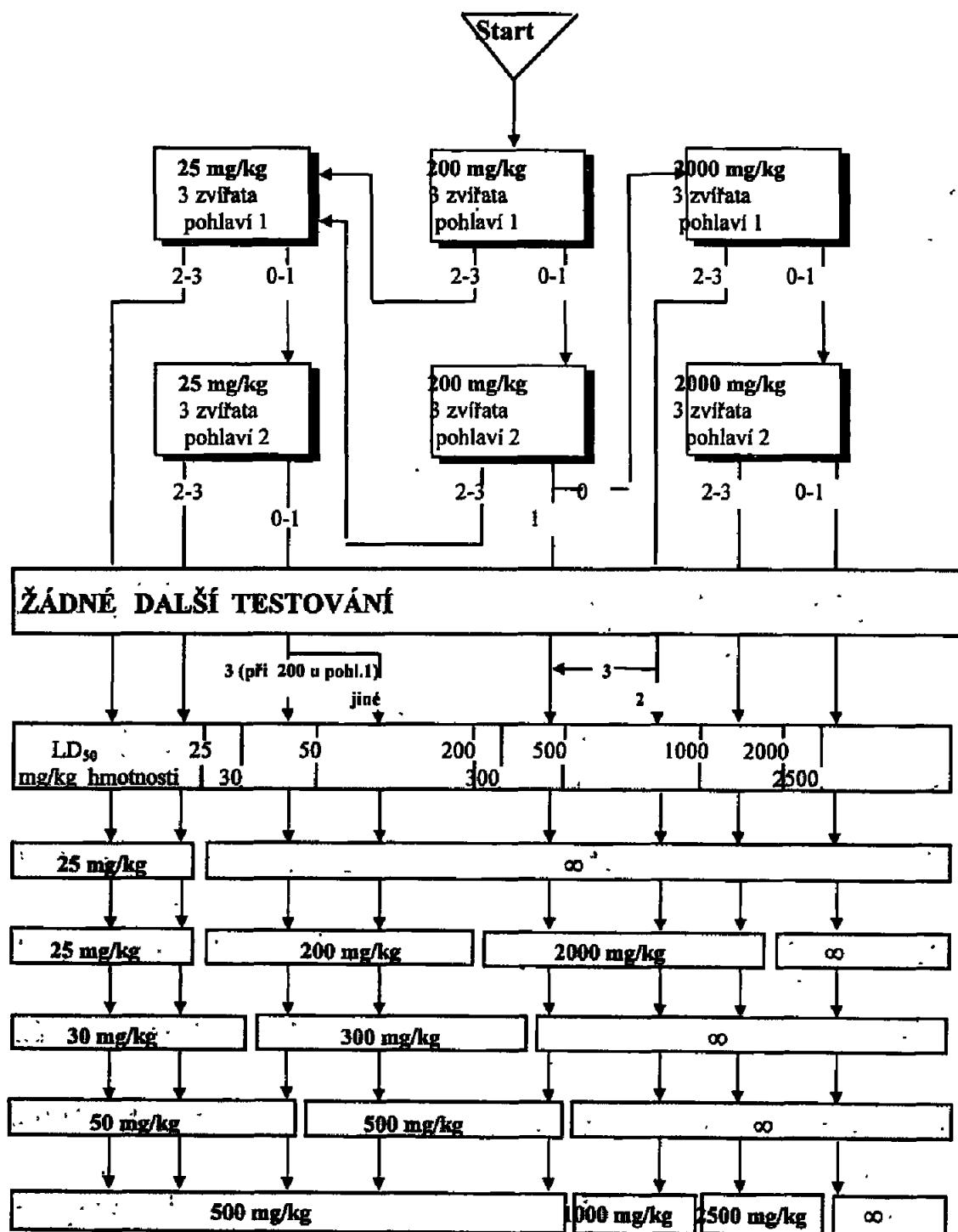


### Interpretace výsledků založených na testovací variantě 1

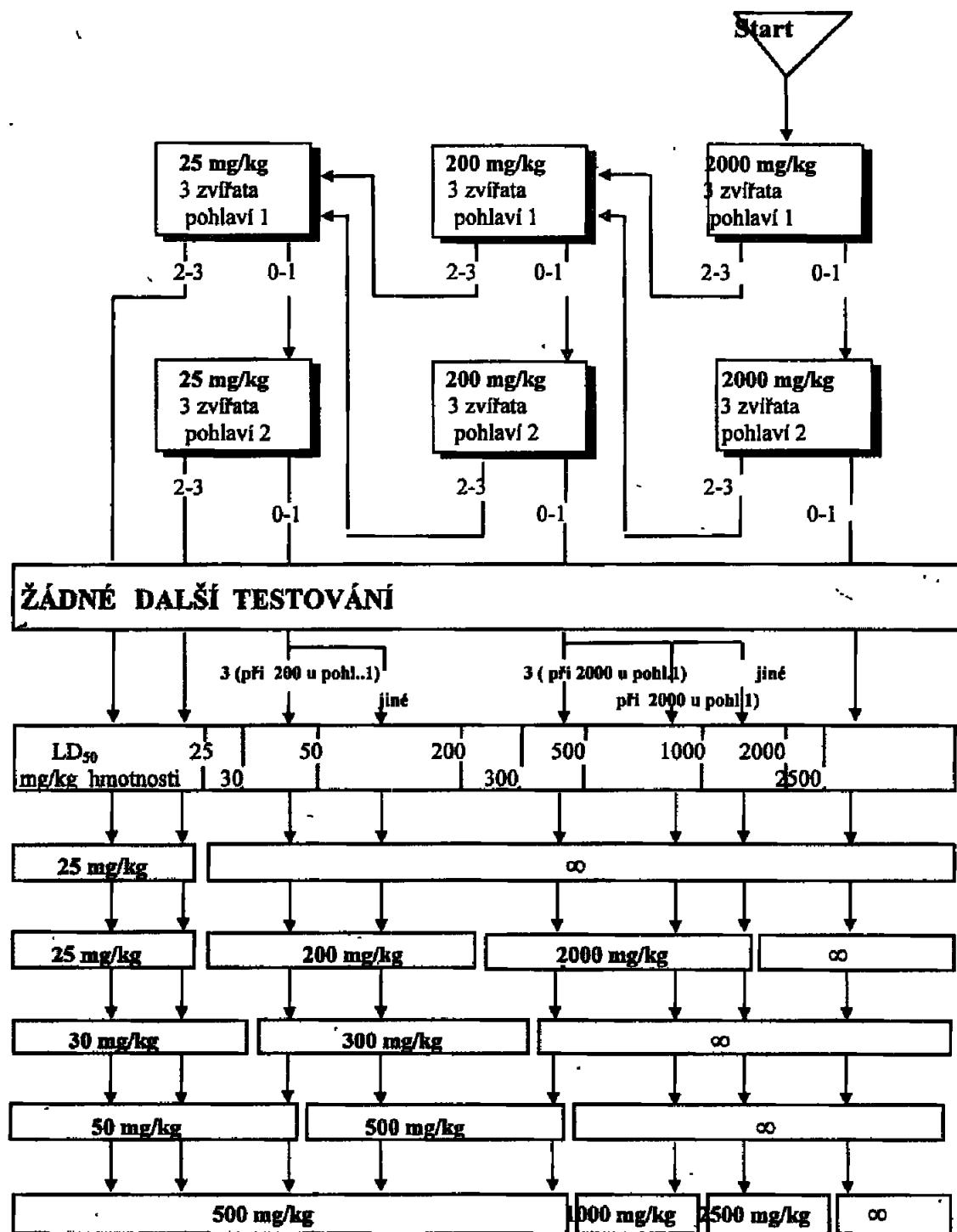
#### a) Výchozí dávka 25 mg/kg tělesné hmotnosti



## b) Výchozí dávka 200 mg/kg tělesné hmotnosti



## c) Výchozí dávka 2000 mg/kg tělesné hmotnosti



## B.2. AKUTNÍ TOXICITA (INHALAČNÍ)

### 1. METODA

#### 1.1 Úvod

Je užitečné před pokusem získat údaje o rozdělení velikosti částic, tenzi par, teplotě tání, teplotě varu, teplotě vzplanutí a výbušnosti (jsou-li stanovitelné) testované látky.

#### 1.2 Princip metody

Několik skupin pokusných zvířat je exponováno studované látce po určenou dobu v odstupňovaných koncentracích, a to jedné koncentraci v každé skupině. Potom se zvířata pozorují a zjišťují se účinky a případy uhynutí. Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí do konce pokusu, se pitvají.

Zvířata se závažnými a přetrávavajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit. Testované látky se nemají podávat v takových koncentracích a takovým způsobem, o kterých je známo, že vyvolávají značnou bolest a stres následkem svých leptavých nebo dráždivých vlastností.

#### 1.3 Popis metody

##### 1.3.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá zvířata náhodně přiřadi do potřebného počtu experimentálních skupin. Pokud to nevyžaduje typ používaného expozičního zařízení, není třeba podrobit zvířata simulované expozici.

Pevné testované látky je třeba rozmělnit na částice příslušné velikosti. Pokud je třeba, přidá se k testované látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla příslušná koncentrace testované látky; v tom případě se zařadí také kontrolní skupina s vehikulem. Pokud se užije pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná aditiva, musí být o nich známo, že nemají toxickej účinek. Existují-li vhodná historická data, je možno je využít.

##### 1.3.2 Experimentální podmínky

###### 1.3.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu. Používá se běžně užívaných pokusných kmenů. Na začátku studie nemá variační rozpětí hmotnosti zvířat překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty (pro každé pohlaví zvlášť).

###### 1.3.2.2 Počet a pohlavi

Pro každou dávkovou hladinu je třeba použít nejméně 10 hladovců (5 samic a 5 samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

**Poznámka:** Používají-li se v akutních testech toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, mělo by se zvážit použití menšího počtu zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zaručit, aby nebyly překročeny mírně toxicke dávky. V těchto testech je třeba vyhnout se podávání letálních dávek testované látky.

#### 1.3.2.3 *Expoziční koncentrace*

Má být dostatečný počet úrovní dávek, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány tak, aby byl u testovacích skupin viditelný rozsah toxických účinků a mortality. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a mortalitou a, pokud je to možné, musí umožnit stanovení LC<sub>50</sub> s přijatelnou spolehlivostí.

#### 1.3.2.4 *Limitní test*

Nedojde-li po 4 hodinové expozici 5 samců a 5 samic plynu v koncentraci 20 mg.l<sup>-1</sup> nebo parám či aerosolu tekuté nebo pevné látky v koncentraci 5 mg.l<sup>-1</sup> (nebo - v případech, kdy tuto koncentraci není možné použít v důsledku fyzikálních nebo chemických vlastností sledované látky včetně rizika výbuchu - při expozici maximální dosažitelné koncentraci) během 14 dnů k žádné mortalitě vyvolané sledovanou látkou, považují se další pokusy za zbytečné.

#### 1.3.2.5 *Doba expozice*

Nejkratší doba expozice má být 4 hodiny.

#### 1.3.2.6 *Vybavení*

Pro pokusy se zvířaty je třeba použít inhalační zařízení, které umožňuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byl zaručen přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční box, je třeba ho konstruovat tak, aby se co nejvíce omezovalo shlukování zvířat a aby inhalační expozice testované látce byla maximální. Pro zajištění stability atmosféry v inhalačním boxu by neměl v zásadě celkový objem pokusných zvířat přesáhnout 5 % objemu boxu. Je také možné použít inhalační expozice orálně-nasální, samotné hlavy nebo individuální celotělové expozice; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

#### 1.3.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla trvat nejméně 14 dní. Nelze ji však stanovit rigorózně. Může záviset na toxických reakcích, na rychlosti jejich vzniku a na trvání fáze zotavení. Dobu pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Rozhodující je doba, kdy se objeví a opět odezní projevy otravy, stejně jako doba do uhynutí, zvláště tam, kde je patrná tendence ke zpožděné mortalitě.

#### 1.3.3 *Popis postupu*

Zvířata se bezprostředně před expozicí zváží. Exponují se po dobu 4 hodin od ustavení rovnováhy koncentrace studované látky. Nastavení rovnováhy by mělo být rychlé. Teplota během pokusu má být 22 °C ± 3 °C. Relativní vlhkost má být ideálně mezi 30 % a 70 %, s výjimkou případů, kde to není možné (např. experimenty s aerosoly). Udržování mírně negativního tlaku uvnitř komory ( $\leq 5$  mm

vodního sloupce) zabrání unikání testované látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Používají se vhodné systémy pro vytvoření a monitorování testovací atmosféry. Systém musí zaručovat, že stabilních podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji. Konstrukce a provoz boxu má zajišťovat homogenní distribuci testované atmosféry v komoře.

Je třeba zajistit měření nebo monitorování podmínek expozice:

- (a) měření průtoku vzduchu (kontinuálně),
- (b) skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zoně alespoň třikrát během expozice (některá ovzduší, např. aerosoly ve vysoké koncentraci, mohou vyžadovat častější monitorování). Během jedné expozice se nemá koncentrace odchylovat od střední hodnoty o více než  $\pm 15\%$ . U některých aerosolů, kde této úrovni regulace není možné dosáhnout, se připouští větší rozsah kolísání. Po celou dobu trvání experimentu mají být koncentrace tak stabilní, jak je to prakticky možné. Pokud se týká častic a aerosolů, měří se distribuce velikosti častic tak často, jak to pokus vyžaduje (ale nejméně jednou pro každou testovanou skupinu),
- c) teplota a vlhkost vzduchu se měří pokud možno kontinuálně.

Během expozice i po jejím skončení se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky. Každé zvíře má svůj individuální protokol. Během prvního dne je třeba provádět pozorování často. Minimálně jednou každý pracovní den je třeba provést pečlivé klinické vyšetření. Další každodenní pozorování a odpovídající opatření mají sloužit maximálnímu snížení ztrát zvířat pro studii, např. pitvou nebo zmrzením uhynulých zvířat nebo izolaci či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějšímu dýchání, tremoru, křečovým jevům, slinění, průjmu, letargii, spánku a komatu. Okamžik uhynutí je třeba zachytit co nejpřesněji. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanovuje po expozici týdně a v okamžiku uhynutí.

Zvířata, která během pokusu uhynou i ta, která přežijí do konce pokusu, se pitvají se zvláštním zřetelem ke všem změnám horní i dolní části dýchacího traktu. Všechny makroskopické patologické změny se zaznamenávají a odeberou se příslušné tkáně pro histopatologické vyšetření.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat vykazujících další příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Změny hmotnosti je třeba vypočítat a zaznamenat pokud zvířata přežijí déle než jeden den. Zvířata, která jsou humánně utracena vzhledem ke stresu nebo k bolestem vyvolaným testovanou látkou, jsou zaznamenána jako uhynutí vyvolaná testovanou látkou. LC<sub>50</sub> se vypočte uznávanou metodou. Dále se hodnotí vztah - pokud existuje - mezi expozicí zvířete testované látce a výskytem a stupněm všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických poškození, změn tělesné hmotnosti, mortality a všech dalších toxických účinků.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje pokud možno následující informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky ustájení, krmení, atd.
- podmínky pokusu: popis expozičního zařízení včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému a způsobu umístění zvířat v expozičním boxu, pokud je používán. Je třeba popsat přístroje pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, koncentrace a distribuce velikosti částic aerosolu.

- údaje o expozici se sestaví do tabulky a uvedou spolu s průměrnými hodnotami a charakteristikou variability (např. směrodatnou odchylkou). Mají pokud možno obsahovat tyto údaje:

- a) rychlosť průtoku vzduchu v inhalačním zařízení;
- b) teplota a vlhkost vzduchu;
- c) nominální koncentrace (celkové množství testované látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);

*Pozn.: při expozici aerosolům látek v roztoku (např. ve vodě) je třeba uvádět nejen výslednou koncentraci látky ve vzduchu, nýbrž také, pokud je to možné, koncentraci účinné látky ve vehikulu.*

- d) povaha vehikula, pokud bylo užito;
- e) skutečná koncentrace v dýchací zóně; f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (GSD);
- g) doba do ustavení rovnováhy;
- h) doba expozice:

- tabulky toxicitních reakcí podle pohlaví a úrovně expozice (tj. počet zvířat, která v pokuse uhynula nebo byla humánně utracena; počet zvířat s příznaky toxicity; počet exponovaných zvířat);

- doba uhynutí během expozice nebo po jejím skončení, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat;

- všechna pozorování;
- hodnota LC<sub>50</sub> pro každé pohlaví stanovená po skončení doby pozorování (s uvedením metody výpočtu);
- 95%-ni interval spolehlivosti pro LC<sub>50</sub> (pokud je možno jej stanovit);
- křivka závislosti mortality na dávce (koncentraci) a její směrnice (pokud to dovoluje metoda stanovení): - pitevní nálezy;
- všechny histopatologické nálezy;
- diskuse výsledků (se zvláštním zřetelem k vlivu případného utracení zvířat z humánních důvodů během testu na vypočtenou hodnotu LC<sub>50</sub>);
- interpretace výsledků.

### B.3. AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

#### 1. METODA

##### 1.1 Princip metody

Testovaná látka se nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Pozorují a zaznamenávají se účinky a případy uhynutí. Zvířata, která uhynou během pokusu, i zvířata, která přežijí konec pokusu, se pitvají.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit. Testované látky se nemají podávat v takových dávkách a takovým způsobem, o kterých je známo, že vyvolávají značnou bolest a stres následkem svých leptavých nebo dráždivých vlastností.

##### 1.2 Popis metody

###### 1.2.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v pokusných klecích v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Asi 24 hodin před zahájením testu se srst zvířat na zádech ostříhá nebo oholí. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se nepoškodila (např. abrazí) kůže, což by mohlo změnit její propustnost. Pro aplikaci testované látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při pokusech s pevnými látkami, případně připravenými v práškové formě, je třeba látku dostatečně navlhčit vodou nebo vhodným vehikulem, aby byl dobrý kontakt s kůží. Při použití vehikula je nutné brát v úvahu vliv vehikula na průnik testované látky kůži. Výběr vehikula by se měl řídit tím, v jaké formě se může daná látka ostat do styku s lidskou kůží, a ze všech relevantních způsobů vybrat ten, který nejvíce usnadňuje průnik kůži. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěné.

###### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Pužívá se dospělých potkanů nebo králíků. Lze použít i jiné živočišné druhy, pokud jsou pro to důvody. Je třeba volit známé kmeny pokusných zvířat. Na začátku testu by nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek použít nejméně 5 zvířat stejného pohlaví. Používá-li se samic, musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud je k dispozici informace, že jedno z obou pohlaví je výrazně citlivější, je třeba používat zvířata tohoto pohlaví.

*Poznámka:* Používají-li se v akutních testech toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hladovci, mělo by se zvážit použití menšího počtu zvířat. Dávky je třeba pečlivě zvolit a je třeba zajistit, aby se nepřekročily mírně toxické dávky. V těchto testech je třeba vyhnout se podávání letálních dávek testované látky.

#### 1.2.2.3 *Dávkování*

Má být dostatečný počet dávkových úrovní, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány tak, aby vznikly testovací skupiny se zřetelným rozsahem toxických účinků a mortality. Při rozhodování o úrovních dávek je třeba vzít v úvahu dráždivé nebo leptavé účinky testované látky. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a účinkem, a pokud možno umožnit stanovení LD<sub>50</sub> s přijatelnou spolehlivostí.

#### 1.2.2.4 *Limitní test*

Lze provést limitní test jednou dávkou nejméně 2000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti na skupinách 5 samců a 5 samic s použitím výše popsaných postupů. Pokud látka způsobí uhynutí, je třeba provést úplnou studii.

#### 1.2.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování má být nejméně 14 dní. Nelze ji však stanovit rigorózně. Měla by být určena podle obrazu otravy, rychlosti vývoje otravy a trvání fáze zotavení. Dobu pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Rozhodující je doba, kdy se příznak otravy projeví a vymíže a doba do uhynutí, zvláště tam, kde je patrná tendence k výskytu pozdních uhynutí.

#### 1.2.3 *Popis postupu*

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Testovaná látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. Pro vysoce toxické látky může být tato plocha menší; mělo by se však aplikovat stejnou měrou na co největší část této plochy.

Testovaná látka je po expoziční době 24 hodin udržována v kontaktu s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Testovanou plochu je dále třeba vhodným způsobem překrýt, aby se mulový obvaz a testovaná látka fixovaly a aby se zabránilo orálnímu příjmu. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplnou immobilizaci však nelze doporučit.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky testované látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem se provede očištění pokožky.

Pozorování je třeba ihned systematicky zaznamenávat. Pro každé zvíře je třeba vést samostatné záznamy. První den se zvířata pozorují často. Nejméně jednou každý pracovní den je třeba provést pečlivé klinické vyšetření. Další každodenní pozorování a odpovidající opatření mají sloužit maximálnímu snížení ztrát zvířat pro studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací a utracením slabých či umírajících zvířat.

Pozorování zahrnuje změny srsti, kůže, na kterou byla provedena aplikace, očí a sliznic, a také dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečovým jevům, slinění, průjmu, letargii, spánku a komatu.

Okamžik uhynutí je třeba zachytit co nejpřesněji. Zvířata, která během pokusu uhynou, i která přežijí až do konce pokusu, se pitvají. Všechny makroskopické patologické změny se zaznamenávají a poškozené tkáně se odeberou pro histopatologické vyšetření.

#### 1.2.3.1 *Hodnocení toxicity u druhého pohlavi*

Po dokončení studie na jednom pohlaví se podá látka nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví, aby se zjistilo, zda zvířata druhého pohlaví nejsou výrazně citlivější na testovanou látku. V konkrétních případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata testovaného pohlaví jsou výrazně citlivější, testování na zvířatech druhého pohlaví je možno vynechat.

### 2. ÚDAJE

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými projevy otravy, popis toxických účinků a pitevních nálezů. Stanovení hmotnosti jednotlivých zvířat se provede bezprostředně před podáním testované látky, pak v týdenních intervalech a před utracením. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežijí-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánnim způsobem utracena s ohledem na stres a bolesti vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané touto látkou. LD<sub>50</sub> se vypočte uznávanou metodou. Dále se hodnotí vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat testované látce a výskytem a stupněm všech abnormalit včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézi, změn tělesné hmotnosti, mortality a všech ostatních toxických účinků.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, krmení atd.,
- podmínky pokusu (včetně způsobu očištění kůže a typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),
- úrovně dávek (včetně vehikula, pokud je užito) a koncentrace,
- pohlaví pokusných zvířat,
- tabulky toxických reakcí podle pohlaví a podle dávek (počet zvířat uhynulých nebo humánně utracených během testu; počet zvířat s příznaky toxicity; počet exponovaných zvířat),
- doba uhynutí po podání testované látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,
- všechna pozorování,

- hodnota LD<sub>50</sub> pro to pohlaví, u kterého byl proveden úplný pokus, a to pro 14tidenní pozorování (s uvedením metody vypočtu),
- 95%-ní interval spolehlivosti pro LD<sub>50</sub> (pokud jej lze stanovit),
- křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice (pokud je stanovení danou metodou možné),
- pitevní nálezy,
- všechny histopatologické nálezy,
- výsledky všech testů na druhém pohlaví,
- rozbor výsledků (zvláštní pozornost věnovat možnému ovlivnění vypočtené hodnoty LD<sub>50</sub> v souvislosti s utracením zvířat z humánních důvodů během testu),
- interpretace výsledků.

## B.4. AKUTNÍ TOXICITA (KOŽNÍ DRÁŽDIVOST)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

##### Výchozí úvahy

Je třeba pečlivě zvážit všechny dostupné informace o dané látce s cílem snížit na minimum testování látky za podmínek, které mohou vyvolat výrazně těžké reakce. Následující informace může být užitečná pro posouzení, zda je vhodný úplný test, studie na jediném zvířeti nebo zda není zapotřebí další testování.

a) Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita. Silně kyselé nebo zásadité látky (např. pH rovné či menší 2 nebo pH rovné či větší 11,5) není třeba testovat na primární kožní dráždivost, jestliže mohou být očekávány leptavé účinky. Je třeba vzít v úvahu také alkalickou nebo kyselou rezervu.

b) Jestliže jsou dostupné přesvědčivé doklady závažných účinků látky ze spolehlivě validizovaných *in vitro* testů, není vyžadován úplný test.

c) Výsledky ze studií akutní toxicity. Jestliže byla látka v testu akutní toxicity po dermální aplikaci studována při limitní úrovni dávky ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti) a nebylo pozorováno podráždění kůže, není třeba dále testovat kožní dráždivost. Rovněž není třeba testovat látky vysoce toxické při dermální cestě vstupu

Studovaná látka se nanese v jednorázové dávce na kůži několika pokusných zvířat, přičemž každé zvíře slouží jako svoje vlastní kontrola. Po stanovené době se odečte, vyhodnotí a následně popiše stupeň podráždění, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba pozorování musí být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit také reverzibilitu pozorovaných účinků.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Asi 24 hodin před zahájením testu se srst zvířat na zádech ostříhá nebo oholí. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se nepoškodila kůže (např. abrazi). Je možno použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králika mají ostrůvky husté srsti, které jsou výraznější v některých obdobích roku. Testované látky se nesmí nanášet na tyto zóny růstu husté srsti.

Při pokusech s pevnými látkami, případně připravenými v práškové formě, je třeba testovanou látku dostatečně navlhčit vodou, případně jiným vhodným vehikulem, aby byl dobrý kontakt s kůží. Při použití vehikula je nutné brát v úvahu vliv vehikula na podráždění kůže testovanou látkou. Testované kapaliny se zpravidla aplikují nezředěné.

## 1.2.2 Experimentální podmínky

### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Je možné použít různé druhy savců, je však třeba dát přednost albínu králíka.

### 1.2.2.2 Počet zvířat

Jestliže je z *in vitro* screeningových testů nebo jiných úvah podezření, že látka může vyvolávat nekrózu (např. je leptavá) je třeba uvážit provedení testu na jednom zvířeti. Jestliže výsledky tohoto testu nenačnáčují leptavé účinky, je třeba doplnit testování na dvou dalších zvířatech.

Pro úplný test jsou nutná nejméně tři zdravá dospělá zvířata. Není třeba zvláštních zvířat pro neošetřenou kontrolní skupinu, pro vyjasnění případu nejednoznačných reakcí mohou být použita další zvířata.

### 1.2.2.3 Dávkování

Pokud nejsou žádné zvláštní důvody pro jiný postup, nanese se na testovací místo kůže 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g tuhé nebo polotuhé látky. Přilehlé oblasti neošetřené kůže zvířete slouží v testu jako vlastní kontrola.

### 1.2.2.4 Doba pozorování

Dobu pozorování není možno stanovit rigorózně. Musí být dostatečně dlouhá, aby bylo možno úplně vyhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků. Normálně není třeba překračovat dobu 14 dnů po aplikaci.

## 1.2.3 Popis postupu

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Testovaná látka se nanese na malou plochu (asi 6 cm<sup>2</sup>) kůže a pokryje se plátkem mulu přidržovaným nedráždivou náplastí. U kapalin a některých past může být vhodné nanést nejprve testovanou látku na mulu, a pak jej připevnit na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným okluzivním nebo částečně okluzivním obvazem. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a mohlo přijmout testovanou látku orálně nebo ji vdechnout.

Na konci doby exposice je třeba odstranit zbylou testovanou látku vodou, pokud je to možné, nebo vhodným rozpouštědlem, ale tak, aby nebyla ovlivněna případná reakce kůže nebo celistvost pokožky.

Doba expozice je obvykle 4 hodiny.

Pokud existuje podezření, že látka může vyvolat nekrózu (např. tím, že působí poleptání), je třeba zkrátit délku expozice (např. na 1 hodinu nebo 3 minuty). Při takovém testování je možné použít nejprve jediné zvíře a aplikovat 3 plátky mulu současně, pokud to akutní dermální toxicita testované látky nevyulučuje. První plátek se odstraní po 3 minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhý plátek po 1 hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačuje, že je nezbytná 4-hodinová expozice a že neodporuje principu humánního zacházení, odstraní se třetí plátek po 4 hodinách a klasifikují se stupně odpovědi kůže. V případě, že byla možná 4 hodinová expozice, je třeba doplnit test s použitím nejméně dvou dalších zvířat; pokud to není kontraindikováno z humánních důvodů (např. jestliže po 4 hodinách expozice je pozorována nekróza kůže).

Jestliže je závažná kožní reakce (např. nekróza) pozorována po 3 minutách nebo po 1 hodině, je test okamžitě ukončen.

Za určitých podmínek je možné navrhnut delší expozice, například pokud to odpovídá očekávanému způsobu použití a expozici u člověka

#### 1.2.3.1 *Pozorování a vyhodnocení*

Zvířata je třeba pozorovat na příznaky erytému a kožního edému a stupeň reakce kůže po 60 minutách a dále 24, 48 a 72 hodin po odstranění plátku s testovanou látkou. Stupeň podráždění kůže se klasifikuje a zaznamenává podle systému uvedeného v tabulkou 1. Jestliže nebylo během 72 hodin dosaženo úplného odeznění reakce, provádí se pozorování dále. Vedle podráždění kůže je třeba podrobně popsat všechny závažné léze jako poleptání (nevratná destrukce kožní tkáně) a jiné toxické účinky. K objasnění pochybných reakcí nebo odpovědi, maskovaných zabarvením kůže testovanou látkou, je třeba použít technik histopatologického vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

### 2. ÚDAJE

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každé pokušné zvíře patrný stupeň podráždění posouzením erytému a edému po celou dobu pozorování. Je třeba rovněž uvést všechny závažné léze, popis stupně a povahy podráždění kůže, reversibilitu nebo poleptání a všechny další pozorované toxicke účinky.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje pokud možno tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, krmení atd.,
- experimentální podmínky (včetně relevantních fyzikálně chemických vlastností testované látky, technik přípravy a čištění kůže, typ obvazu, okluzivní, semiokluzivní,
- ve formě tabulky údaje o kožní reakci pro každé jednotlivé zvíře při každém pozorování (za 1, 24, 48 a 72 hodin atd. po odstranění mulu),
- popis zjištěných vážných poškození včetně poleptání,
- popis intenzity a povahy zjištěného podráždění a případně histopatologických nálezů,
- popis všech dalších toxicke účinků vedle podráždění kůže,
- diskuse výsledků.
- vyhodnocení výsledků.

## 4. DODATEK

## 4.1. Stupnice reakce kůže

	Hodnota
1. Hodnocení erytému a příškvaru	
1.1 Žádný erytém	0
1.2 Velmi slabý erytém (stěží viditelný)	1
1.3 Zřetelně viditelný erytém	2
1.4 Mírný až výrazný erytém	3
1.5 Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru (hloubkové poškození - nekroza) znemožňující posouzení erytému	4
2. Hodnocení edému	
2.1 Žádný edém	0
2.2 Velmi lehký edém (stěží viditelný)	1
2.3 Lehký edém (okraje jsou zřetelné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
2.4 Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
2.5 Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

4.2 Klasifikace podle indexu kožní dráždivosti ( $I_{KI}$ )

$I_{KI}$  se vypočte jako aritmetický průměr ze součtu stupně reakce pro erytém a edém v jednotlivých intervalech odečtu u jednoho jedince a z takto získaných hodnot u všech exponovaných jedinců se vypočte aritmetický průměr.

Klasifikace	$I_{KI}$
nedráždí	$I_{KI} \leq 0,5$
lehce dráždí	$0,5 < I_{KI} \leq 3$
středně dráždí	$3 < I_{KI} \leq 5$
silně dráždí	$I_{KI} > 5$

## B.5. AKUTNÍ TOXICITA (OČNÍ DRÁŽDIVOST)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

##### 1.1.1 Výchozí úvahy

Je třeba pečlivě zvážit všechny dostupné informace o dané látce s cílem snížit na minimum testování látky za podmínek, které mohou vyvolat těžké reakce. K tomu mohou být užitečné následující informace.

a) Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita. Např. silně kyselé nebo zásadité látky, které - jak je možno očekávat - vyvolají v oku pH rovné či menší 2 nebo pH rovné či větší 11,5, není třeba testovat, pokud lze očekávat závažná poškození. Je třeba vzít v úvahu také alkalickou nebo kyselou rezervu.

b) Výsledky spolehlivě validizovaných alternativních studií; látky s prokázanými potenciálně leptavými nebo silně dráždivými vlastnostmi nemají být dále testovány na dráždivost pro oko, protože lze předpokládat, že tyto látky budou mít závažné účinky na oko při testování touto metodou.

c) Výsledky ze studií kožní dráždivosti. Látky, které vykazovaly zřejmě leptavé nebo výrazně dráždivé účinky na kůži ve studii kožní dráždivosti, není třeba dále testovat na dráždivost pro oko, protože lze předpokládat že budou mít na oči závažné účinky.

Testovaná látka se v jednorázové dávce aplikuje do jednoho oka několika pokusným zvířatům, přitom neexponované oko slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se odečte a vyhodnotí stupeň podráždění a reakce se dále popíše, aby bylo možno provést úplné posouzení účinku. Doba pozorování musí být dostatečně dlouhá, aby bylo možné jednoznačně zhodnotit také vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

24 hodin před testem se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky se z experimentu vyloučí.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Ačkoliv se používají různé druhy pokusných zvířat, doporučuje se dávat přednost zdravému dospělému albinotickému králiku.

### 1.2.2.2 Počet zvířat

Jestliže se očekávají výrazné účinky, je třeba zvolit test na jediném zvířeti. Jestliže výsledky tohoto testu na jednom králikovi naznačují, že látka má výrazně dráždivé (reversibilní účinek) nebo leptavé (irreversibilní účinek) účinky pro oko při použití popsaného postupu, není třeba další testování oční dráždivosti u dalších zvířat. K vyšetření specifických aspektů mohou být případně testována další zvířata.

V ostatních případech je třeba použít nejméně tří zvířat. Vyjasnění nejednoznačných nálezů může vyžadovat použití dalších zvířat.

### 1.2.2.3 Úroveň dávky

Při testování kapalin se používá dávka 0,1 ml. U tuhých látek, past a zrnitých látek je třeba použít objem 0,1 ml nebo hmotnost cca 0,1 g (hmotnost je vždy třeba uvést). Jedná-li se o tuhou nebo hrubě zrnitou látku, je třeba ji rozemlit na jemný prášek. Objem homogenní látky se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáváním na měrnou nádobku.

U látek uzavřených ve sprejích s pumpou nebo tlakových aerosolových nádobkách je třeba vystříknout a sebrat 0,1 ml látky a instilovat ji do oka podle popisu pro kapaliny.

### 1.2.2.4 Doba pozorování

Délku doby pozorování není možno stanovit rigorózně. Musí být dostatečně dlouhá, aby bylo možno posoudit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků. Normálně však stačí 21 dnů po aplikaci studované látky.

### 1.2.3 Popis postupu

Zvířata je třeba přechovávat jednotlivě v klecích. Testovaná látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na 1 sekundu lehce k sobě přidrží, aby se žádná látka neztratila. Druhé oko, na které se látka neaplikuje, slouží jako kontrolní.

Jestliže se předpokládá, že látka může vyvolat přílišnou bolest, lze před instilací testované látky použít lokální anestetikum. Aby bylo zajištěno, že následkem anestetika nedojde k významným změnám v reakci na testovanou látku, je třeba pečlivě zvolit typ, koncentraci a dobu aplikace lokálního anestetika. Stejným způsobem se musí anestezovat i kontrolní oko.

Oči pokusných zvířat je možno vymývat nejdříve 24 hodiny po aplikaci testované látky. Po 24 hodinách je možno oči vypláchnout, pokud se to považuje za vhodné.

U některých látek, které při této testovací metodě vyvolají podráždění, je možno provést další zkoušky s použitím králiků, kterým se brzy po instilaci látky vymyjí oči. V těchto případech se doporučuje použít 3 králiky. Půl minuty po instilaci se oči vymývají rovněž po půl minuty s použitím takového objemu kapaliny a rychlosti průtoku, aby nedošlo k poškození.

### 1.2.3.1 Pozorování a vyhodnocení

Oči se vyšetřují po 1, 24, 48 a 72 hodinách. Neprojevují-li se po 72 hodinách žádné příznaky očních lézí, je možno zkoušku ukončit. Dobu pozorování je třeba prodloužit, pokud přetravá postižení rohovky nebo jiné příznaky podráždění oka

tak, aby bylo možno posoudit vývoj změn a jejich vratnost či nevratnost. Vedle pozorování na rohovce, duhovce a spojivce je třeba zaznamenat a uvést ve zprávě i jiné zjištěné léze.

Intenzitu reakce oka je třeba při každém vyšetření stanovit podle stupnice v příloze a zaznamenat. (Klasifikace reakcí oka připouští různé možnosti interpretace. Jako pomůcku pro testujícího laboratoře a ty, kdo provádějí hodnocení, je možno použít ilustrovanou referenční tabulkou podráždění oka.)

Vyšetřování reakcí je možno usnadnit použitím binokulární lupy, ruční štěrbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 hodinách je možno oči některých nebo všech zvířat vyšetřit mimoto ještě fluoresceinem.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každé pokusné zvíře patrný stupeň podráždění v daném intervalu pozorování. Je třeba uvést popis stupně a charakteru podráždění, přítomnost závažných lézí a všechny mimooční účinky.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje následující informace:

- údaje o zvířatech (druhu, kmen, původ, podmínky chovu, krmení atd.,
- experimentální podmínky (včetně relevantních fyzikálně-chemických vlastností testované látky),
- v tabelární formě výčet dráždivých nebo leptavých účinků pro jednotlivá zvířata při každém pozorování (např. po 1, 24, 48 a 72 hodinách),
- popis všech zjištěných závažných lézí,
- podrobný popis intenzity, charakteru a vratnosti zjištěného podráždění a poleptání, včetně postižené oblasti rohovky,
- popis metody hodnocení pro jednotlivé časové body (1, 24, 48 a 72 hod.), např. štěrbinová lampa, oční mikroskop, fluorescein atd.,
- popis všech zjištěných mimoočních místních účinků,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

#### 4. DODATEK

##### 4.1 Stupnice změn na oku

	Hodnota
<b>A. Spojivka - otok</b>	
Edém není přítomen	0
Slabý edém zahrnující mžurku	1
Výrazný edém s everzí víčka	2
Edém způsobující uzavření víček na polovinu	3
Edém zavírající víčka více než na polovinu nebo zcela	4
<b>B. Spojivka - slzení</b>	
Slzení není přítomno	0
Slabé slzení (nutno odlišit od běžné sekrece ve vnitřním koutku	1
Slzení se zvlněním víček a srsti v blízkosti oka	2
Slzení se zvlněním víček a srsti v širokém okoli oka	3
<b>C. Spojivka - enantém</b>	
Cévní kresba normální	0
Nastříknutí cév zřetelně výraznější oproti normě	1
Splývající cévní kresba, rozlišení jednotlivých cév nesnadné, difusnější jasně červená barva	2
Difuzní tmavě červená barva	3
<b>D. Duhovka - anomálie</b>	
Anomálie nejsou přítomny	0
Nepravidelná struktura duhovky, překrvní, otoky, nastříknutí cév kolem rohovky (jedna nebo více těchto charakteristik), reakce na světlo je zachovaná, případně opožděná	1
Reakce na světlo není přítomná, rozsáhlé destrukce a hemoragie v duhovce (jedna nebo více těchto charakteristik)	2
<b>E. Rohovka - stupeň neprůhlednosti</b>	

	Hodnota
Neprůhlednost není přítomná	0

Neprůhledná oblast je difuzního diseminovaného charakteru, detaily 1 duhovky zůstávají jasně viditelné

Neprůhledná oblast je průsvitná, snadno se identifikuje, detaily 2 duhovky lehce zastřené

Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou vůbec 3 viditelné; obrys zornice stěží viditelný

Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná                          4

#### F. Rohovka - plocha neprůhlednosti

Neprůhlednost je pozorovatelná, ale její plocha je  $\leq 1/4$  plochy 1 rohovky

$1/4 < \text{plocha neprůhlednosti} \leq 1/2$  plochy rohovky                          2

$1/2 < \text{plocha neprůhlednosti} \leq 3/4$  plochy rohovky                          3

plocha neprůhlednosti  $> 3/4$  plochy rohovky                          4

#### 4.2 Výpočet akutního indexu oční dráždivosti ( $I_{OA}$ )

Individuální index oční dráždivosti ( $I_{OI}$ ) pro každé zvíře a každý interval hodnocení se vypočte podle vztahu

$$I_{OI} = 2.(A+B+C) + 5.D + 5.E.F$$

Průměrný index oční dráždivosti ( $I_{OP}$ ) pro každý interval hodnocení se vypočte pro každý interval hodnocení jako průměr z  $I_{OI}$ .

Akutní index oční dráždivosti  $I_{OA}$  je roven nejvyššímu  $I_{OP}$  zjištěnému v průběhu testu

#### 4.3 Klasifikace

Klasifikace	$I_{OA}$
nedráždí	0 - 4,9
mírně dráždí	5 - 14,9
dráždí	15 - 29,9
silně dráždí	30 - 59,9
velmi silně dráždí	60 - 79,9
extrémně dráždí	80 - 110

## B.6. SENZIBILIZACE KŮŽE

### 1. METODA

#### 1.1. Úvod

##### *Poznámky:*

Citlivost a detekční schopnost testů pro zjišťování látek s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži jsou považovány za významné pro klasifikační systém toxicity v oblasti veřejného zdravotnictví.

Neexistuje jediná testovací metoda, která by dostatečně spolehlivě identifikovala všechny látky s potenciálním senzibilizačním účinkem pro lidskou kůži a která by se hodila pro všechny látky.

Při volbě testu je třeba uvažovat faktory jako např. fyzikální charakteristiky látky, včetně schopnosti průniku kůži.

Testy na morčatech lze rozdělit na testy s adjuvans, ve kterých je alergický stav potencován rozpuštěním nebo suspendováním testované látky ve Freundově kompletním adjuvans (FCA), a na testy bez adjuvans.

Testy s adjuvans se zdají být přesnější v predikci pravděpodobného senzibilizačního účinku pro lidskou kůži než metody bez Freundova kompletního adjuvans, a proto se jim dává přednost.

Maximizační test na morčatech(Guinea-pig Maximization Test - GPMT) je velmi rozšířený test s adjuvans. Ačkoliv k odhalení schopnosti látky vyvolat senzibilizační reakci existuje několik dalších metod, je GPMT považován za preferovanou techniku s adjuvans.

U mnoha skupin chemických látek jsou testy bez adjuvans (přednost se dává Buehlerovu testu) považovány za méně citlivé.

V určitých případech lze zdůvodnit volbu Buehlerova testu s povrchovou aplikací spíše než intradermální injekci používanou v maximizačním testu na morčatech. Pro použití Buehlerova testu je třeba uvést odborné důvody.

V této metodické kapitole jsou popsány maximizační test na morčeti (GPMT) a Buehlerův test. Lze použít i jiných metod, pokud jsou spolehlivě validizované a pokud jsou odborné důvody pro jejich použití.

Pokud screeningový test provedený uznávanou metodou dá pozitivní výsledek, je možno testovanou látku označit jako potenciální senzibilizátor bez dalšího testování na morčatech. Při negativním výsledku je však nutné provést test na morčeti, tak jak je popsán v této metodické kapitole.

#### 1.2 Definice

*Senzibilizace kůže:* (alergická kontaktní dermatitida) je imunologicky zprostředkována kožní reakce na látku. U člověka mohou být reakce charakterizované svěděním, zarudnutím kůže, otokem, pupenci, puchýřky, bulami

(velkými puchýři) nebo kombinací těchto příznaků. U jiných živočišných druhů se mohou reakce lišit a může být zjištěno pouze zarudnutí nebo otok.

*Indukční expozice:* experimentální expozice subjektu testované látce se záměrem navodit stav přecitlivělosti.

*Indukční období:* období nejméně jednoho týdne po indukční expozici, v průběhu kterého se může rozvinout stav přecitlivělosti.

*Provokační expozice (challenge):* experimentální expozice subjektu dříve vystaveného testované látce po indukčním období pro stanovení, zda subjekt odpoví reakcí přecitlivělosti.

### 1.3 Referenční látky

Citlivost a spolehlivost použité experimentální metody by měla být ověřována každých šest měsíců s použitím látek, o kterých je známo, že mají mírný až středně silný senzibilizační účinek pro kůži.

U správně provedeného testu se očekává reakce na mírné/střední senzibilátory nejméně 30 % u metody s adjuvans, a nejméně 15 % u metody bez adjuvans.

Přednost se dává následujícím látkám:

Číslo CAS	Číslo EINECS	chemický název	generický /obchodní název
101-86-0	202-983-3	2-hexyl-3-fenyl-2-propenal	alfa-hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	2-merkaptobenzothiazol	kaptax
94-07-7	202-303-5	Ethyl ester kyseliny p-aminobenzoové(	benzokain

Mohou nastat okolnosti, kdy při dostatečném odborném zdůvodnění mohou být použity jiné kontrolní látky splňující výše uvedená kritéria.

### 1.4 Princip testovací metody

Pokusná zvířata jsou nejprve exponována testované látce intradermálními injekcemi případně epidermální aplikací (indukční expozice). Po období 10 až 14 dnů (indukční období), v průběhu kterého se může rozvinout imunitní reakce, jsou zvířata exponována provokační dávce. Rozsah a stupeň kožní reakce na provokační expozici u testovaných zvířat je porovnáván s rozsahem a stupněm reakce u kontrolních zvířat, která podstoupí klamnou expozici v době indukce a je jim aplikována provokační dávka.

### 1.5 Popis testovacích metod

Jestliže je považováno za nezbytné odstranit testovanou látku, provede se to s použitím vody nebo vhodného rozpouštědla tak, aby nebyla narušena vzniklá kožní reakce nebo integrita pokožky.

## 1.5.1 Maximizační test na morčatech (G P M T)

### 1.5.1.1 Příprava

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky po dobu aspoň 5 dnů před zahájením testu. Před testem se zvířata náhodně rozdělí do expozičních a kontrolních skupin. Odstranění srsti se provede stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité testovací metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením testu a na konci testu.

### 1.5.1.2 Experimentální podmínky

#### 1.5.1.2.1 Pokusná zvířata

Používají se běžné laboratorní kmeny albinotických morčat.

#### 1.5.1.2.2 Počet a pohlaví

Lze použít samce i samice. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Exponovanou skupinu tvoří nejméně 10 zvířat a nejméně 5 zvířat je třeba v kontrolní skupině. Použije-li se menšího počtu než 20 testovaných a 10 kontrolních morčat a není možné dojít k závěru, že testovaná látka je senzibilizátor, doporučuje se testování na dalších zvířatech, aby se dosáhlo celkového počtu nejméně 20 testovaných a 10 kontrolních zvířat.

#### 1.5.1.2.3 Dávkové úrovně

Koncentrace testované látky použitá pro každou indukční expozici se upraví na takovou úroveň, kterou zvířata celkově dobře snášejí a která je nejvyšší působící mírně až střední podráždění kůže. Jako provokační koncentrace se použije maximální koncentrace, která u nesenzibilizovaných zvířat nevyvolává podráždění kůže. V případě potřeby je možno vhodné koncentrace stanovit v předběžném pokusu na dvou nebo třech zvířatech. Pro tento účel lze uvážit použití zvířat, kterým bylo aplikováno FCA.

### 1.5.1.3 Popis postupu

#### 1.5.1.3.1 Indukce

Den 0 - Testovaná skupina

Následující 3 dvojice subkutánních injekcí, každá po 0,1 ml, se podají do lopatkové oblasti zbavené srsti symetricky podle střední linie:

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smíšené s vodou nebo fyziologickým roztokem v objemovém poměru 1:1;

Injekce 2: testovaná látka ve vhodném vehikulu ve zvolené koncentraci;

Injekce 3: testovaná látka ve zvolené koncentraci připravená ve směsi FCA s vodou nebo fyziologickým roztokem v objemovém poměru 1 : 1.

Pro injekci 3 se látky ve vodě rozpustné rozpustí před smíšením s FCA ve vodné fázi. Látky rozpustné v lipidech nebo látky nerozpustné se rozpálí v nezředěném FCA. Konečná koncentrace testované látky pro injekci 3 má být stejná jako pro injekci 2.

Injekce 1 a 2 se aplikují blízko sebe a co nejbliže hlavě, zatímco injekce 3 směrem ke kaudální části testovací plochy.

### Den 0 - Kontrolní skupina

Následující 3 dvojice subkutálních injekcí, každá po 0,1 ml, se podají do stejných míst jako u testovaných zvířat:

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smíšené s vodou nebo fyziologickým roztokem v objemovém poměru 1:1;

Injekce 2: neředěné vehikulum;

Injekce 3: Směs vehikula (50 %, váha / objem) se směsi FCA/vody nebo fyziologického roztoku v poměru 1 : 1 (objem / objem).

### 5. - 7. den - Testované a kontrolní skupiny

Přibližně dvacet čtyři hodin před lokální indukční aplikací, jestliže látka není dráždivá pro kůži, se na testovací plochu po důkladném ostříhání případně oholeni natře 0,5 ml 10 % laurylsulfátu sodného ve vazelině, za účelem navození místního podráždění.

### 6. - 8. den - Testovaná skupina

Testovací plocha se zbaví srsti. Testovanou látkou ve vhodném vehikulu je napuštěn filtrační papír (2 x 4 cm), který se pak přiloží na testovací plochu a fixuje pomocí okluzivního obvazu na dobu 48 hodin. Výběr vehikula se řídí odbornými důvody; pevné látky jsou jemně rozetřeny a převedeny do vhodného vehikula; kapaliny lze aplikovat přímo.

### 6. - 8. den - Kontrolní skupina

Testovací plocha se znova zbaví srsti. Samotné vehikułum se nanese a zafixuje podobně jako u exponované skupiny na dobu 48 hodin.

#### 1.5.1.3.2. Provokace

### 20. - 22. den - Testované a kontrolní skupiny

Boky exponovaných i kontrolních zvířat jsou zbaveny srsti. Na jeden bok zvířete je aplikována testovaná látka v plátku nebo v komůrce a na druhý bok se stejným způsobem aplikuje pouze vehikulum (pokud je to třeba). Plátky se pomocí okluzivního obvazu udržují v kontaktu s kůží po 24 hodiny.

#### 1.5.1.3.3. Pozorování a vyhodnocení: testované a kontrolní skupiny

- přibližně 21 hodin po odstranění náplasti se provokační plocha vyčistí, důkladně ostříhá případně oholi a v případě potřeby depiluje;
- přibližně po dalších třech hodinách (přibližně 48 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se pozoruje kožní reakce a zaznamenává se podle stupnice uvedené v dodatku;
- přibližně 24 hodin po tomto pozorování se provede druhé pozorování a záznam reakce kůže (72 hodin).

Doporučuje se systém "slepého odečtu" u testovaných i kontrolních zvířat, kdy pozorující osoba neví, které zvíře bylo senzibilizováno a které je kontrolní.

Pokud je k vyjasnění výsledků nutná druhá provokace (tj. opakovaná provokace), provede se přibližně o týden později, v případě potřeby znovu s kontrolní skupinou s vehikulem. Opakovanou provokaci lze také provést na původní kontrolní skupině.

Všechny kožní reakce a neobvyklé nálezy, včetně celkových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů se zaznamenávají podle stupnice Magnussona / Kligmana (viz dodatek). K objasnění sporných nálezů je možno použít dalších technik, jako např. histopatologického vyšetření nebo měření tloušťky kožních řas.

### 1.5.2 Buehlerův test

#### 1.5.2.1 *Příprava*

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky po dobu aspoň 5 dnů před zahájením testu. Před testem se zvířata náhodně rozdělí do expozičních a kontrolních skupin. Odstranění srsti se provede stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité testovací metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením testu a na konci testu.

#### 1.5.2.2 *Experimentální podmínky*

##### 1.5.2.2.1 Pokusná zvířata

Používají se běžné laboratorní kmeny albinotických morčat.

##### 1.5.2.2.2. Počet a pohľavy

Lze použít samce a/nebo samice. Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Použije se minimálně 20 zvířat v testované skupině a nejméně 10 zvířat v kontrolní skupině.

##### 1.5.2.2.3 Dávkové úrovně

Koncentrace testované látky použitá pro každou indukční expozici se upraví na takovou úroveň, která je nejvyšší působící mírně ale ne velmi silně podráždění kůže. Jako provokační koncentrace se použije maximální koncentrace, která u nesenzibilizovaných zvířat nevyvolává podráždění kůže. V případě potřeby je možno vhodné koncentrace stanovit v předběžném pokusu na dvou nebo třech zvířatech.

Pro testované látky rozpustné ve vodě je vhodné použít vodu nebo zředěný nedráždící roztok detergentu jako vehikula. Pro jiné látky je preferován 80 % roztok etanol / voda pro indukci a aceton pro provokaci.

#### 1.5.2.3 *Postup*

##### 1.5.2.3.1. Indukce

Den 0 - Testovaná skupina

Jeden bok je zbaven srsti (důkladně ostříhaný). Systém plátkového testu se dokonale nasytí testovanou látkou ve vhodném vehikulu (výběr vehikula se řídí odbornými důvody; kapaliny lze případně aplikovat přímo).

Plátkový test je přiložen na testovací plochu a přidržován v kontaktu s kůží překrývacím plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

Systém plátkového testu musí být okluzivní. Vhodný je bavlněný polštárek, at' už kruhový nebo čtverhranný, s plochou přibližně 4 - 6 cm<sup>2</sup>. Je preferováno přidržení

s použitím vhodného přidržovače, aby se zajištila okluze. Jestliže je použito obvázání, mohou být nutné další expozice.

#### Den 0 - Kontrolní skupina

Jeden bok je zbaven srsti (důkladně ostříhán). Na testovací plochu je naneseno pouze vehikulum, a to podobným způsobem jako u testované skupiny. Plátkový test je přiložen na testovací plochu a přidržován v kontaktu s kůží překrývacím plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem po dobu 6 hodin. Pokud je možno prokázat, že negativní kontrolní skupina není nutná, lze použít čisté kontrolní skupiny bez aplikace.

#### 6. - 8. a 13. - 15. den - Testovaná a kontrolní skupina

Stejná aplikace jako v den 0 se provede na stejnou testovací plochu na tomtéž boku (zbavenou případně srsti) 6.-8. den a znova 13.-15. den.

#### 1.5.2.3.2. Provokace

##### 27. - 29. den - Testovaná a kontrolní skupina

Neošetřený bok testovaných a kontrolních zvířat je zbaven srsti (důkladně ostříhán). Okluzivní plátek obsahující příslušné množství testované látky v maximální nedráždivé koncentraci se aplikuje na zadní část neošetřeného boku testovaných a kontrolních zvířat. Na přední část neošetřeného boku testovaných a kontrolních zvířat se případně může aplikovat okluzní plátek s vehikulem. Překrývací plátky nebo komůrky jsou přidržovány v kontaktu s kůží vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

#### 1.5.2.3.3. Pozorování a hodnocení

- přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha zbaví srsti;
- přibližně o tři hodiny později (přibližně 30 hodin po aplikaci provokačního plátku) se pozorují kožní reakce a zaznamenávají podle stupnice uvedené v dodatku;
- přibližně po dalších 24 hodinách (tj. přibližně 54 hodin po aplikaci provokačního plátku) se kožní reakce znovu pozorují a zaznamenají.

Doporučuje se systém "slepého odečtu" u testovaných i kontrolních zvířat, kdy pozorující osoba neví, které zvíře bylo senzibilizováno a které je kontrolní.

Pokud je k vyjasnění výsledků nutná druhá provokace (tj. opakována provokace), provede se přibližně o týden později, v případě potřeby znova s kontrolní skupinou s vehikulem. Opakovou provokaci lze také provést na původní kontrolní skupině.

Všechny kožní reakce a neobvyklé nálezy, včetně celkových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů se zaznamenávají podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). K objasnění sporných nálezů je možno použít dalších technik, jako např. histopatologického vyšetření nebo měření tloušťky kožních řas.

## 2. SBĚR A ZÁZNAM ÚDAJŮ (GPMT A BUEHLERŮV TEST)

Údaje se sestaví do tabulky, ze které musí být pro každé pokusné zvíře patrná reakce kůže při každém pozorování.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA (GPMP A BUEHLERŮV TEST)

Pokud byl proveden před zahájením testu na morčatech test screeningový, je třeba uvést popis tohoto testu nebo jeho citaci (např. LLNA - test regionálních lymfatických uzlin, MEST - test ztluštění ucha u myší) včetně všech podrobností postupu a výsledků získaných pro testované a referenční látky.

#### 3.1. Zpráva o průběhu pokusu (GPMT a Buehlerův test)

Zpráva o pokusu obsahuje tyto informace, pokud mohly být získány :

*Pokusná zvířata.*

- použitý kmen morčat;
- počet, stáří a pohlaví zvířat;
- podmínky chovu, strava atd.;
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a konci testu.

*Experimentální podmínky:*

- způsob přípravy místa pro plátkový test;
- podrobné informace o materiálech a technice plátkového testu;
- výsledek pilotní studie se závěrem o indukčních a provokačních koncentracích pro vlastní test;
- podrobné informace o přípravě, aplikaci a odstranění testované látky;
- zdůvodnění výběru vehikula;
- koncentrace a celková množství testované látky a vehikula, použitá pro indukci a provokaci.

*Výsledky:*

- souhrn výsledků poslední kontroly citlivosti a spolehlivosti (viz 1.3.) včetně použité referenční látky, její koncentrace a vehikula;
- všechna pozorování pro každé zvíře včetně systému klasifikace;
- slovní popis charakteru a stupně pozorovaných účinků;
- všechny histopatologické nálezy.

*Diskuse výsledků*

*Závěry*

### 4. LITERATURA

Tato metoda je analogická s metodou OECD TG 406.

**Dodatek****5.1 Stupnice Magnussenova/Kligmana pro hodnocení vyvolaných patologických reakcí**

- 0 = žádná viditelná změna;
- 1 = slabé nebo skvrnité zarudnutí kůže;
- 2 = středně výrazné a splývající zarudnutí kůže;
- 3 = intenzivní zarudnutí a zduření kůže.

**5.2 Klasifikace potenciálu senzibilizace**

Podle frekvence pozitivity při provokační expozici, tj. podle toho kolik zvířat v rámci pokusu bylo danou látkou senzibilizováno, se látka klasifikuje jako

- slabý alergen (I.st.) - 0-8% zvířat
- mírný alergen (II.st.) - 9-28% zvířat
- středně silný alergen (III.st.) - 29-64% zvířat
- silný alergen (IV.st.) - 65-80% zvířat
- extrémní alergen (V.st.) - 81-100% zvířat

## B.7. SUBAKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (28 Denní opaková aplikace)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává denně po 28 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat orálně, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během období podávání se zvířata denně pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Pitva se provede u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během pokusu; také zvířata, která přežijí konec pokušu, se utratí a pitvají.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Zdravá mladá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolní skupiny a jednotlivých experimentálních skupin. Klece jsou uspořádány tak, aby se co nejvíce vyloučil vliv umístění klece. Každé jednotlivé zvíře je jednoznačně označeno. Nejméně 5 dní před začátkem studie jsou zvířata chována v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu.

Testovanou látku lze podávat sondou nebo v potravě nebo v pitné vodě, podle účelu studie a fyzikálně-chemických vlastností látky.

Pokud je to třeba, rozpustí nebo suspenduje se testovaná látka ve vhodném nosiči (vehikulu). Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku / suspenze, pak použití roztoku / emulze v jedlého rostlinném oleji (např. kukuřičném) a pak roztoku v jiných nosičích. Pro nevodná vehikula musí být známa jejich toxicita charakteristika; pokud není známa, musí být stanovena ještě před testem. Je nezbytné ověřit stabilitu látky v zvoleném vehikulu.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, ale je možno použít i jiného druhu hlodavců. Je třeba používat mladých zdravých zvířat z běžně užívaných pokusných kmenech. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavu a v každém případě dříve než zvířata dosáhnou věku 9 týdnů.

Na začátku studie by nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty.

Pokud má tato studie sloužit jako předběžný pokus před dlouhodobou studií, je třeba v obou studiích použít zvířata stejného kmene a ze stejného zdroje.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou hladinu dávek se použije nejméně 10 zvířat (5 samic a 5 samců). Pokud se zvířata budou zabíjet v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou zabita před koncem pokusu.

Mimoto je možno podávat další skupině (satelitní skupině) 10ti zvířat (5 zvířat každého pohlaví) po dobu 28 dnů nejvyšší dávku a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnosti, trvání nebo zpožděný výskyt toxicických účinků. Používá se také satelitní skupiny 10 kontrolních zvířat (5 zvířat každého pohlaví).

#### 1.2.2.3. V o l b a d á v e k

Je třeba použít nejméně tři úrovně dávek a jednu kontrolní skupinu. S výjimkou aplikace testované látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako s pokusnými. Používá-li se vehikulum pro usnadnění aplikace, podává se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, které obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka.

Pokud se podle dostupných informací nedá očekávat účinek při denní dávce  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti, je možno provést limitní test. Nejsou-li taková data k dispozici, lze provést předběžnou vyhledávací studii za účelem stanovení dávek.

Při výběru dávek je třeba vzít v úvahu všechny existující údaje z toxikologických a toxikokinetických studií o testované látce případně látkách příbuzných.

Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxicke účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí ani velké utrpení. Dále se vyberou dávky v klesající řadě tak, aby umožnily prokázat závislost účinku na dávce. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity (NOAEL). Obvykle je vhodný dvoj- až čtyřnásobný odstup mezi sousedními dávkami; pokud je potřeba pokrýt větší rozsah dávek, je lepší přidat čtvrtou dávkovou skupinu, než zvolit příliš velký odstup mezi dávkami (např. faktor větší než 10).

Pokud se testovaná látka podává v potravě nebo pitné vodě, je důležité zajistit, aby podávané množství látky neovlivňovalo výživu a vodní rovnováhu. Podává-li se testovaná látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm) nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitou alternativu je třeba uvést. Aplikuje-li se látka sondou, mělo by se tak dít každý den ve stejnou dobu, a dávkování přizpůsobovat změnám tělesné hmotnosti zvířete.

Pokud má tato studie sloužit jako předběžný pokus před dlouhodobou studií, je třeba v obou studiích použít stejné potravy.

#### 1.2.2.4. L i m i t n í t e s t

Neprokáže-li test provedený zde popisovaným způsobem žádné toxicke účinky při dávce  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti za den nebo při takové koncentraci v potravě nebo vodě, která této dávce odpovídá, a pokud toxicita testované látky nevyplývá z analogie s příbuznými látkami, je možno od provedení kompletního testování při třech dávkových úrovních upustit. Toto pravidlo limitního testu platí, pokud údaje o expozici lidí nenaznačují, že je třeba testovat při vyšších dávkách.

#### 1.2.2.5. D o b a p o z o r o v á n í

Doba pozorování je 28 dní. Zvířata satelitní skupiny jsou pozorována nejméně dalších 14 dnů bez aplikace s cílem zachytit případné zpožděné účinky a pro posouzení přetravávání nebo vratnosti účinku.

### 1.2.3. Popis postupu

Zvířatům se podává testovaná látka 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů, ve zdůvodněných případech 5 dní v týdnu. Denní dávka se podává jednorázově žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Maximální objem tekutiny, který může být podán najednou, závisí na velikosti zvířete. Objem by neměl normálně přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, v případě vodných roztoků lze podat i 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. Rozdíly v podávaném objemu je třeba minimalizovat upravením koncentrace tak, aby byl podáván týž objem na všech úrovních dávky. Neplatí to u látek dráždivých a leptavých, u kterých je třeba obvykle počítat se stupňovanými účinky při vyšších koncentracích.

#### 1.2.3.1 Všeobecné pozorování

Všeobecné klinické pozorování se provádí nejméně jednou denně, nejlépe v tutéž denní době a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po aplikaci. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede zběžná prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Zvířata moribundní a zvířata projevující silnou bolest nebo stres jsou vyřazena, utracena humánním způsobem a pitvána.

Důkladné klinické vyšetření všech zvířat se provede před první aplikací (za účelem intraindividuálního porovnání) a dále nejméně jednou týdně. Toto pozorování se děje mimo chovnou klec v standardním pozorovacím prostoru a nejlépe pokaždé ve stejnou denní dobu. Výsledky pozorování se pečlivě zaznamenávají, nejlépe s použitím skórovacího systému, standardizovaného v testující laboratoři. Je třeba zajistit, aby se podmínky pozorování měnily co nejméně; osoba, provádějící pozorování by nejlépe neměla znát příslušnost zvířat do dávkových skupin.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů, změny dýchání a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic) a případně další. Zaznamenávají se změny chůze, polohy, dále reakce na manipulaci, přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (vytrvalé čistící pohyby nebo kroužení) nebo bizarních vzorců chování (např. sebepoškozování, pohyb pozadu).

Ve čtvrtém týdnu aplikace se otestují reakce na různé senzorické podněty (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), změří se síla úchopu a celková motorická aktivita. Další podrobné informace o postupech, které je možno k testování použít, jsou uvedeny v literatuře (viz Všeobecný úvod, část B).

Pozorování funkčních poruch ve čtvrtém týdnu aplikace lze případně vynechat, pokud 28-denní studie slouží jako předběžná studie pro následující studii subchronickou (90-denní); v tom případě je pozorování funkčních poruch zařazeno do této dlouhodobé studie. Ovšem i v tomto případě jsou údaje o funkčních poruchách ve čtvrtém týdnu 28-denní studie vhodným východiskem pro výběr dávek pro subchronickou studii.

Výjimečně lze vynechat pozorování funkčních poruch u skupin vykazujících takové příznaky toxicity, které by při posuzování funkčního stavu zvířete vadily.

#### 1.2.3.2 Tělesná hmotnost a příjem potravy a vody

Zvířata se váží nejméně jednou týdně. Spotřeba potravy a vody se měří nejméně jednou týdně, také v případě aplikace v pitné vodě.

### 1.2.3.3 Hematologie

Hematologické vyšetření na konci pokusu zahrnuje stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a změření srážlivosti krve.

Krev se odebere těsně před nebo v průběhu utracení zvířete, místo odkud se krev odebrala se zaznamená. Krev se skladuje za vhodných podmínek.

### 1.2.3.4 Biochemická analýza

Biochemická analýza krve za účelem posouzení závažných toxických účinků na tkáně, zvláště na játra a ledviny, se provede u všech zvířat těsně před nebo v průběhu utracení (kromě zvířat uhynulých nebo utracených během pokusu). Doporučuje se nechat zvířata bez potravy přes noc před odběrem krve<sup>(11)</sup>. Vyšetření plazmy a sera zahrnuje stanovení sodíku, drasliku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatinu, celkových proteinů, albuminu, aktivity alespoň dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gama glutamyltranspeptidáza, sorbitoldehydrogenáza). Změření dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin může v některých případech poskytnout užitečné informace.

Další možnost je časově definovaný sběr a vyšetření moči během posledního týdne studie: hodnotit je možno vzhled, objem, osmolalitu nebo specifickou hmotnost, pH, bílkoviny, glukózu a krev příp. krvinky.

Dále je třeba uvážit stanovení nespecifických indikátorů poškození tkání v séru.

Další charakteristiky je třeba stanovit u látek známých nebo podezřelých z působení na určité metabolické funkce: stanovení vápníku, fosforu, triglyceridů na lačno, lipidů, specifických hormonů, methemoglobinu, aktivity cholinesterázy. Účelnost těchto vyšetření se posuzuje podle příslušnosti do určitých skupin látek nebo případ od případu

Obecně je třeba postupovat pružně, brát v úvahu použitý živočišný druh a pozorované nebo očekávané účinky dané látky.

Pokud nejsou k dispozici údaje o normálních hodnotách některých hematologických nebo biochemických proměnných, je třeba uvážit jejich stanovení ještě před začátkem studie.

### 1.2.3.5 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů, dutiny lební, hrudní a břišní, a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat se rádně očistí od ulpěných tkání a co nejdříve po sekci se zváží ve vlnkém stavu, aby se předešlo vysychání.

<sup>11)</sup> Vyšetření na lačno je žádoucí pro řadu měření v séru a plazmě, zvláště pro glukózu. Hlavní důvod pro toto doporučení je to, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jenné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně, hladovění přes noc by mohlo mít vliv na celkový metabolismus a u aplikace v potravě by zasáhla do pravidelnosti expozice testované látky. Pokud se odebírá krev na lačno, je třeba biochemické vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu testu.

Následující tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými změnami, mozek (reprezentativní oblasti včetně hemisfér, mozečku a mostu), míchu, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezinu, srdce, brzlík, štítnou žlázu, průdušnici a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a pak ponořením), gonády a přidatné pohlavní orgány (např. dělohu, prostatu), močový měchýř, lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis), nejlépe v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (nebo čerstvý nátěr z naslé kostní dřeně). Podle klinických nebo jiných nálezů je možno zvolit i další tkáně. Každý orgán, který by mohl být cílovým orgánem pro působení testované látky, je třeba uchovat.

#### 1.2.3.6. Histopatologická vyšetření

U všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny je třeba provést histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Pokud se v orgánech a tkáních ve skupině s nejvyšší dávkou objeví poškození způsobená testovanou látkou, je nutno provést histologické vyšetření těchto tkání i u všech skupin s nižšími dávkami.

Všechny makroskopické léze je třeba vyšetřit.

U zvířat satelitních skupin, pokud byly do studie zařazeny, je třeba provést histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, ve kterých se objevily účinky otravy u ostatních exponovaných zvířat.

### 2. SBĚR A ZÁZNAM ÚDAJŮ

K dispozici musí být údaje o každém jednotlivém zvířeti. Navíc jsou veškeré údaje sumarizovány do tabulkové formy, uvádějící u každé testované skupiny počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu testu nebo utracených z humánních důvodů, dobu úmrtí jednotlivých zvířat, popis toxicických příznaků včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého příznaku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat s jednotlivými typy lézí.

Výsledky v číselné formě je třeba vyhodnotit vhodnou a uznávanou statistickou metodou. Statistickou metodu je třeba zvolit již při plánování studie.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o pokusu obsahuje tyto informace, pokud mohly být získány :

##### Pokusná zvířata:

- živočišný druh / kmen;
- počet, stáří a pohlaví zvířat;
- zdroj, podmínky chovu, potrava atd.;
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku testu, dále v týdenních intervalech a na konci testu.

##### Podmínky testování:

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud je jiné než voda;
- zdůvodnění výběru dávek;
- podrobné údaje o úpravě testované látky pro aplikaci, případně o přípravě diety, o dosažených koncentracích, stabilitě a homogenitě přípravku;
- podrobné údaje o způsobu aplikace testované látky;
- přepočet z koncentrace látky v dietě nebo vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg na kg tělesné hmotnosti (pokud jde o aplikaci v dietě nebo vodě);
- podrobné údaje o potravě a kvalitě vody (včetně druhu a zdroje);

*Výsledky:*

- tělesná hmotnost a její změny;
- spotřeba potravy a vody;
- údaje o toxicických reakcích podle pohlaví a dávkové úrovně, včetně popisu příznaků toxicity;
- povaha, závažnost a trvání klinických nálezů, příp. zda jsou vratné nebo nevratné;
- posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity;
- výsledky hematologického vyšetření s příslušnými normami;
- výsledky biochemického vyšetření s příslušnými normami;
- tělesná hmotnost při utracení a hmotnosti orgánů;
- pitevní nálezy;
- podrobný popis všech histopatologických nálezů;
- údaje o absorpci, pokud byly získány;
- statistické zpracování výsledků.

*Diskuse výsledků:*

*Závěry:*

4. LITERATURA

Tato metoda je analogická metodě OECD TG 407.

## B.8. SUBAKUTNÍ TOXICITA INHALAČNÍ (28 DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

### 1. METODA

#### 1.1 Úvod

Před pokusem je třeba získat údaje o testované látce, rozdělení velikosti částic, tenže par, bod tání, bod varu, bod vzplanutí a výbušnost (jsou-li stanovitelné).

#### 1.2 Princip metody

Několik skupin pokusných zvířat je exponováno studované látce denně po určitou dobu, v odstupňovaných koncentracích, každá skupina jedné koncentraci, a to po 28 dní. Použije-li se pro dosažení vhodné koncentrace testované látky v atmosféře vehikulum, je třeba použít kontrolní skupinu pro vehikulum. Během trvání pokusu se zvířata denně pozorují a zjišťují se příznaky toxicických účinků. Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí do konce pokusu, se pitvají.

#### 1.3 Popis metody

##### 1.3.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá zvířata náhodně přiřadi do jednotlivých experimentálních skupin. Pokud je třeba, přidá se k testované látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla příslušná koncentrace testované látky. Pokud se užije pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná aditiva, musí být o nich známo, že nemají toxicický účinek. Existují-li vhodná historická data, je možno je využít.

##### 1.3.2 Experimentální podmínky

###### 1.3.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu. Pracuje se na mladých zdravých zvířatech z běžně užívaných pokusných kmenů. Na začátku studie nemá variační rozpětí hmotnosti zvířat překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty (pro každé pohlaví zvlášť).

###### 1.3.2.2 Počet a pohlavi

Pro každou testovanou skupinu je třeba použít nejméně 10 zvířat (5 samic a 5 samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se zvířata budou zabíjet v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou zabita před koncem pokusu. Mimoto je možno exponovat vysoké koncentraci satelitní skupinu 10ti zvířat (5 zvířat každého pohlaví) po dobu 28 dnů a během následujících 14 dnů sledovat vratnost, přetravávání nebo zpožděný výskyt toxicických

účinků. Používá se také satelitní skupiny 10 kontrolních zvířat (5 zvířat každého pohlavi).

#### 1.3.2.3 *Expoziční koncentrace*

Použijí se nejméně tři skupiny s různou úrovní koncentrace a jedna kontrolní skupina, případně kontrolní skupina s vehikulem - pokud se užije - v koncentraci stejné jako u skupiny s nejvyšší koncentrací testované látky. S výjimkou aplikace testované látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako s pokusnými. Nejvyšší koncentrace má vyvolat toxicke účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí nebo jen v malém počtu. Nejnižší koncentrace by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší koncentrace tuto hodnotu překračovat. Ideálně by střední koncentrace měla vyvolat toxicke účinek na hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 úrovně koncentrací, mají být voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxicke účinky. Ve skupinách s nízkou a střední koncentrací a v kontrolní skupině by počet uhynutí měl být nízký, jinak je vyhodnocení výsledků obtížné.

#### 1.3.2.4 *Trvání expozice*

Trvání expozice má být 6 hodin denně; v případě specifických požadavků je možné použít i jiných dob expozice.

#### 1.3.2.5 *Expoziční zařízení*

Pro pokusy se zvířaty se používá dynamické expoziční zařízení, které zaručuje proudění vzduchu s výměnou nejméně 12krát za hodinu, aby byl zaručen přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční box, je třeba ho konstruovat tak, aby se zamezilo co nejvíce shlukování zvířat a aby inhalační expozice testované látce byla co nejvyšší. Pro zajištění stability atmosféry v inhalačním boxu neměl by v zásadě celkový objem pokusných zvířat přesáhnout 5% objemu boxu. Je možné použít inhalační expozice orálně-nasální, samotné hlavy nebo individuální celotělové expozice; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami

#### 1.3.2.6 *Doba pozorování*

Pokusná zvířata je třeba denně pozorovat během celého období expozice i zotavení a zaznamenávat toxicke účinky. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a čas, ve kterém se objeví a opět odezní toxicke účinky.

#### 1.3.3 *Popis postupu*

Zvířata se exponují testované látce denně, 5 - 7 dnů v týdnu, po dobu 28 dnů. Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, jsou pozorována dalších 14 dnů bez aplikace, k posouzení zotavení z otravy nebo přetravávání toxicke účinků. Teplota během experimentu má být  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Relativní vlhkost má být mezi 30 % a 70 %, s výjimkou případů, kde to není možné (např. experimenty s aerosoly). Udržování mírně negativního tlaku uvnitř komory ( $\leq 5\text{mm}$  vodního sloupce) zabránilo unikání testované látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Používá se dynamický inhalační systém s vhodnou analytickou kontrolou koncentrace. Doporučuje se provést předběžný pokus pro ziskání potřebných koncentrací

Rychlosť prútu vzduchu je treba nastaviť tak, aby podmínky v celém expozičnom boxu byly stejné. Systém musí zaručovať, že stabilných podmínek expozice bude dosaženo co najrýchlejšie.

Měření nebo monitorování podmínek expozice:

- a) Měření průtoku vzduchu (kontinuálně).
- b) Skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zoně. Během jedné expozice se nemá koncentrace odchylovat od střední hodnoty o více než  $\pm 15\%$ . U některých prachů a aerosolů, kde této úrovně regulace není možné dosáhnout, se připouští větší rozsah kolísání. Po celou dobu trvání experimentu mají být koncentrace tak stabilní, jak je to prakticky možné. Pokud se týká častic a aerosolů, měří se distribuce velikosti častic týdně v každé testované skupině.
- c) Teplota a vlhkost vzduchu pokud možno kontinuálně.

Během expozice a po jejím skončení se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky; každé zvíře má svůj individuální protokol. Všechna zvířata je treba denně pozorovat na příznaky toxických účinků a zaznamenávat jejich výskyt, stupeň a trvání. Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Hmotnosti zvířat se zaznamenávají týdně. Doporučuje se zaznamenávat týdně i spotřebu potravy. Je treba zajistit pravidelné prohlížení zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat jako např. v důsledku kanibalismu, autolyzy tkání nebo chybného zařazení.

Po skončení studie se všechna zvířata, která přežila, s výjimkou satelitních skupin, pitvají. Umírající zvířata a zvířata v těžkém stresu či trpící bolestí je treba okamžitě vyřadit, humánně utratit a pitvat.

Na konci pokusu se u všech zvířat včetně kontrolních provedou následující vyšetření:

1. Hematologické vyšetření má zahrnovat alespoň stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a srážlivosti krve.

2. Biochemická analýza krve: k posouzení funkce jater a ledvin stanovit alespoň jeden z těchto parametrů: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamát-pyruvát-transaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamát-oxalacetát-transaminasa), dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení: vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, drasliku, glukózy na lačno, lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro studium širšího spektra účinků.

### 1.3.3.1 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny, plice a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně (dýchací systém, játra, ledviny, slezina, varlata, nadled-

viny a srdce, i všechny orgány s makroskopickými změnami nebo změnami velikosti) je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem, tak aby se zachovala struktura.

#### **1.3.3.2 Histopatologické vyšetření**

U všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší koncentrace, a u zvířat kontrolní skupiny, je třeba provést histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Pokud se v orgánech a tkáních ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená testovanou látkou, je nutno provést histologické vyšetření těchto tkání u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat satelitních skupin je třeba provést histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, ve kterých se objevily účinky otravy u ostatních exponovaných zvířat.

### **2. ÚDAJE**

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu a počet zvířat s jednotlivými formami poškození.

Všechny zjištěné výsledky je třeba vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Je k tomu možno použít kteroukoliv uznávanou statistickou metodu.

### **3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

#### **3.1 Zpráva o průběhu pokusu**

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky ústájení, krmení atd.,
- podmínky pokusu: popis expozičního zařízení včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic a aerosolů, klimatizačního systému, popis likvidace odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat v boxu, pokud je používán. Popsat přístroje pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stability koncentrací a distribuce velikosti částic aerosolu,
- údaje o expozici se sestaví do tabulky a uvedou spolu s průměrnými hodnotami a charakteristikou variability (např. směrodatnou odchylkou). Mají pokud možno obsahovat tyto údaje: a) rychlosť průtoku vzduchu inhalačním zařízením; b) teplota a vlhkost vzduchu; c) nominální koncentrace (celkové množství testované látky přivedené do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu); d) povaha vehikula, pokud bylo užito; e) skutečná koncentrace v dýchací zóně; f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (GSD),
- údaje o toxicckých odpověďích podle pohlaví a podle koncentrací,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxicckých nebo jiných účinků,
- úroveň bez účinku,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- spotřeba potravy a vývoj tělesné hmotnosti,

- hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- biochemická vyšetření a jejich výsledky,
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## B.9. SUBAKUTNÍ TOXICITA - DERMÁLNÍ (28 DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se nanáší na kůži denně po 28 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během období podávání se zvířata denně pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která uhynou během pokusu, i zvířata, která přežije konec pokusu, se pitvají.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Krátce před začátkem pokusu se ostříhá srst na zádech pokusných zvířat. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést cca 24 hodin před experimentem. Ostříhání nebo oholení je potřeba opakovat každý týden. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se nepoškodila kůže (např. abrazi). Pro nanášení se připraví nejméně 10% povrchu těla. Je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže a o velikosti krycího obvazu. Při pokusech s tuhými látkami, které mohou být připadně upraveny do práškové formy, je třeba danou látku dostatečně navlhčit vodou, připadně vhodným vehikulem, aby byl zaručen dobrý kontakt s kůží. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěně. Látka se nanáší denně 5 až 7 dnů v týdnu.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Je možno používat dospělé potkany, králiky nebo morčata. Je možno použít i jiné zvířecí druhy, jejich použití však musí být odůvodněné. Na začátku studie by nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou hladinu dávek použít nejméně 10 zvířat (5 samic a 5 samců) se zdravou kůží. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se zvířata budou zabíjet v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou zabita před koncem pokusu. Mimoto je možno podávat další skupině (satelitní skupině) 10ti zvířat (5 zvířat každého pohlaví) po dobu 28 dnů nejvyšší dávku a během následujících 14 dnů po ukončení expozic sledovat vratnost, trvání nebo zpozděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupiny 10 kontrolních zvířat (5 zvířat každého pohlaví).

#### 1.2.2.3 Dávkování

Je třeba použít nejméně tři úrovně dávek a jednu kontrolní skupinu nebo - pokud se použilo vehikula - kontrolní skupinu s aplikací vehikula. Doba expozice má být nejméně 6 hodin denně. Nanášení testované látky by se mělo provádět každý den ve stejnou dobu. V intervalech týdenních nebo čtrnáctidenních je třeba aplikovanou dávku přizpůsobovat tak, aby se udržovala stálá hladina dávky ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace testované látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako s pokusnými. Používá-li se vehikulum pro usnadnění aplikace, podává se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, které se aplikuje skupině s nejvyšší dávkou. Nejvyšší dávka má vyvolat toxické účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí nebo jen v malém počtu. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhadы expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. Ideálně by střední dávka měla vyvolat jen toxický účinek na hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 úrovně dávek, mají být vmezearané dávky voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupině s nízkou a střední dávkou a v kontrolní skupině by počet uhynutí měl být nízký, jinak je vyhodnocení výsledků obtížné.

Vede-li aplikace testované látky k těžkému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké dávkové úrovně může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li k těžkému poškození kůže, je dokonce za určitých okolností nutno pokus ukončit a provést jej znova s nižšími koncentracemi.

#### 1.2.2.4 Limitní test

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, žádné toxické účinky, není další zkouška nutná.

#### 1.2.2.5 Doba pozorování

Všechna zvířata je třeba denně pozorovat na příznaky otravy. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a dobu, kdy se objeví a případně opět odesní příznaky otravy.

#### 1.2.3 Popis postupu

Zvířata se chovají v klecích po jednom. Exponují se studované látce nejlépe 7 dnů v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata satelitní skupiny, která jsou určena pro následné pozorování, je třeba chovat po dalších 14 dnů bez expozice, aby se mohla pozorovat reparace toxických účinků nebo jejich přetravávání. Doba expozice činí nejméně 6 hodin denně.

Testovanou látku je třeba nanášet rovnoměrně na celou plochu, která představuje asi 10 % povrchu těla; u vysoce toxických látek může být tato plocha menší. Látkou je třeba pokrýt co největší část pokusné plochy rovnoměrně v co nejtenčí vrstvě.

Testovaná látka je po expoziční dobu 24 hodin udržována v kontaktu s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Testovanou plochu je dále třeba vhodným způsobem překrýt, aby se mulový obvaz a testovaná látka fixovaly a aby se zabránilo orálnímu příjmu. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplnou immobilizaci však nelze doporučit. Jako alternativní metody je možno použít "ochranného límce".

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky testované látky, pokud možno vodou nebo s použitím jiného vhodného způsobu očištění pokožky.

Všechna zvířata je třeba denně pozorovat a zaznamenávat příznaky otravy včetně jejich počátku, stupně a trvání. Pozorování zahrnuje změny srsti, kůže, očí a sliznic, a také dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Hmotnosti zvířat se zaznamenávají týdně. Doporučuje se zaznamenávat týdně i spotřebu potravy. Je třeba zajistit pravidelné prohlížení zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat jako např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po skončení studie se všechna zvířata, která přežila, s výjimkou satelitních skupin, pitvají. Umírající zvířata a zvířata v těžkém stresu či trpící bolestí je třeba okamžitě vyřadit, humánně utratit a pitvat.

Na konci pokusu se u všech zvířat včetně kontrolních provedou následující vyšetření:

1. Hematologické vyšetření má zahrnovat alespoň stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a srážlivosti krve.

2. Biochemická analýza krve: k posouzení funkce jater a ledvin stanovit alespoň jeden z těchto parametrů: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamát-pyruvát-transaminasa), aspartáminotransferasa séra (dříve glutamát-oxalacetát-transaminasa), dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení patří stanovení: vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, drasliku, glukózy na lačno, lipidů, hormonů, acidobasicke rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro studium širšího spektra účinků.

#### 1.2.3.1 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva. Aspoň játra, ledviny, nadledviny, plíce a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně např. normální a exponovaná kůže, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny, srdce i všechny orgány s makroskopickými lézemi nebo změnami velikosti) je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření.

#### 1.2.3.2 *Histopatologické vyšetření*

U všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny, je třeba provést histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Pokud se v orgánech a tkáních ve skupině s nejvyšší dávkou, objeví poškození způsobená testovanou látkou, je nutno provést histologické vyšetření těchto tkání i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat satelitních skupin je třeba provést histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, ve kterých se objevily účinky otravy u ostatních exponovaných zvířat.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu a počet zvířat s jednotlivými formami poškození.

Všechny zjištěné výsledky je třeba vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Je k tomu možno použít kteroukoliv uznávanou statistickou metodu.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínkách chovu, krmení atd.),
- experimentální podmínky ( včetně druhu obvazu; okluzivní nebo neokluzivní),
- úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- údaje o toxických odpověďích podle pohlaví a dávky,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- toxické nebo jiné účinky,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- spotřeba potravy a vývoj tělesné hmotnosti,
- hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- biochemická vyšetření a jejich výsledky,
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## B.10. MUTAGENITA ("IN VITRO" CYTOGENETICKÝ TEST NA SAVČÍCH BUŇKÁCH)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test mutagenity pro detekci strukturálních aberací chromozomů v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultur stabilizovaných buněčných linii, tak primárních kultur. Po expozici testované látce v přítomnosti i nepřítomnosti savčího exogenního metabolického aktivačního systému je do buněčné kultury aplikován mitotický jed (např. kolchidin) ke kumulaci dělících se buněk (C metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a pak připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsouobarveny a metafáze jsou analyzovány z hlediska chromozomálních abnormalit.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

###### 1.2.1.1 Buňky

Používají se stabilizované buněčné linie, nebo kultury primárních buněk, např. buňky čínského křečka nebo lidské lymfocyty. Před aplikací na buňky se testované chemické látky rozpustí v kultivačním médiu nebo ve vhodném vehikulu.

###### 1.2.1.2 Metabolický aktivační systém

Buňky se exponují testované látce v přítomnosti i za absence vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji je používána post-mitochondriální frakce doplněná kofaktory, připravená z jater hlodavců ovlivněných enzymatickým induktorem.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### Počet kultur

Pro každý experimentální bod se používají nejméně dvě kultury.

###### Negativní a pozitivní kontroly

Rozpouštědlo (jestliže jako rozpouštědlo není použito kultivační médium nebo voda), aktivační směs, aktivační směs a rozpouštědlo, a neovlivněná kultura jsou použity jako negativní kontroly.

Mimoto zahrnuje každý experiment pozitivní kontrolu. Použije-li se k aktivaci testované chemické látky směs pro metabolickou aktivaci, je třeba jako pozitivní kontrolu použít sloučeninu, která prokazatelně vyžaduje metabolickou aktivaci.

###### Koncentrace

Je třeba použít nejméně tři koncentrace studované látky. Rozpětí koncentrací by mělo být takové, aby se hodnota dekadického logaritmu lišila nejméně o jednu, přičemž nejvyšší koncentrace by měla blokovat mitotickou aktivitu asi o 50 %, nebo vykazovat jiné známky cytotoxicity. Jestliže není látka toxicální, měla by být testována až na hranici rozpustnosti, nebo do maximální koncentrace 5 mg/ml.

#### *Kultivační podmínky*

Je třeba používat vhodná kultivační média a dodržovat kultivační podmínky (např. teplotu, kultivační nádoby, koncentraci CO<sub>2</sub> a vlhkost).

#### **1.2.3 Popis postupu**

##### *1.2.3.1 Příprava kultur*

*Stabilizované buněčné linie:* Buňky se získají ze zásobních kultur (např. trypsinací nebo setřepáním), vysejí se ve vhodné hustotě do kultivačních nádob a kultivují při 37 °C.

*Lidské limfocyty:* ke kultivačnímu médiu se přidá fytohemaglutinin, bovinní sérum, antibiotika a plná heparinizovaná krev. Kultivace probíhá při 37 °C.

##### *1.2.3.2 Expozice kultur testované látky*

###### *(a) Expozice bez směsi pro metabolickou aktivaci*

Je třeba, aby všechny expozice pokrývaly nejméně trvání jednoho celého buněčného cyklu. Okamžik fixace je třeba volit tak, aby byly analyzovány první vyskytnuvší se mitózy po expozici.

Pokud expozice nepokrývá celou dobu buněčného cyklu, je třeba volit různé doby fixace, aby se akumulovaly buňky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu (tj. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>).

Testované chemické látky se přidávají ke kulturám stabilizovaných buněčných linií v exponenciální fázi růstu. Kultury lidských limfocytů se exponují v semisynchronní fázi růstu.

###### *(b) Expozice se směsi pro metabolickou aktivaci*

Testovaná látka by měla být přítomna spolu s aktivačním systémem co nejdéle, aniž by přitom vyvolávala toxicální účinek na buňky. Pokud by tato expozice neměla z důvodu toxicity obsáhnout dobu celého buněčného cyklu, je třeba volit různé doby fixace, aby se akumulovaly buňky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu (např. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>).

#### *Zpracování buněk:*

Buněčné kultury jsou ovlivněny inhibitorem dělícího vřeténka po odpovídající dobu před jejich zpracováním. Každá kultura je zpracovávána pro přípravu preparátů k analýze chromozómů samostatně.

Je potřeba buňky zpracovat nejméně ve dvou časových bodech. Doporučuje se, aby jeden časový bod odpovidal přibližně jednomu buněčnému cyklu a druhý byl později. Tím se mají pokrýt všechny fáze buněčného cyklu a počítat s jeho připadným zpožděním.

### 1.2.3.3 *Analýza chromozómů - příprava mikroskopických preparátů*

Příprava zahrnuje vystavení buněk hypotonizaci, fixaci, nanesení na podložní sklíčko a obarvení.

#### *Analýza*

Nejméně 100 dobře rozprostřených metafázi na kulturu se analyzuje na chromozomové aberace. Podložní sklíčka se před analýzou zakódují. U lidských lymfocytů se analyzují pouze metafáze se 46 centromerami.

Ve stabilizovaných buněčných liniích se vyhodnocují metafáze, jejichž počet se od modálního počtu liší o  $\pm 2$  centromery.

Kromě toho je třeba pro každou dávkou úroveň zhodnotit mitotický index nebo jiný ukazatel cytotoxicity.

## 2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky. Aberace chromatidového typu (gapy, zlomy, výměny), aberace chromozomového typu (gapy, zlomy, minutes, prstence, dicentrické a polycentrické chromozomy) a počet aberantních metafázi (včetně gapů a bez gapů) se uvedou samostatně pro všechny exponované kultury a kontrolní kultury.

Údaje se zpracují odpovídajícími statistickými metodami.

Výsledky se porovnají s odpovídajícími negativními kontrolami.

Provádějí se nejméně 2 nezávislé experimenty. Jeden experiment bude postačující, je-li to vědecky zdůvodnitelné. Není nezbytně nutné provádět druhý experiment za zcela identických podmínek jako první experiment. K ziskání užitečných údajů je možné některé podmínky druhého experimentu pozměnit.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- použité buňky.
- experimentální podmínky: složení média, koncentrace CO<sub>2</sub>, teplota při kultivaci, doba kultivace, dávkování, doba expozice, doba působení a koncentrace mitotického jedu, typ metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly,
- počet buněčných kultur.
- počet analyzovaných metafázi (samostatné údaje pro jednotlivé kultury,
- mitotický index nebo jiné známky cytotoxicity
- typ a počet aberací pro exponovanou a kontrolní kulturu, modální počet chromozomů v použitých stabilizovaných buněčných liniích,
- statistické vyhodnocení.
- diskuse výsledků,
- vyhodnocení výsledků.

## B.11. MUTAGENITA ("IN VIVO" CYTOGENETICKÁ ANALÝZA CHROMOSOMŮ KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Tento cytogenetický test *in vivo* je krátkodobý test mutagenity pro detekci strukturálních chromozornových aberací. Všeobecně se analyzují chromozomové aberace v prvních mitózách po expozici. U chemických mutagenů je většina indukovaných aberací chromatidového typu.

Při této metodě se používají savci, kterým se vhodnou cestou aplikují testované látky a kteří se v určitých okamžicích usmrť pro zpracování buněk kostní dřeně. Před usmrcením zvířat se tato navíc exponují mitotickému jedu, např. kolchicinu, ke kumulaci dělicích se buněk (C-metafáze). Z buněk se připraví mikroskopické preparáty sušené na vzduchu a obarví se. Metafáze se mikroskopicky vyšetřují k určení chromozomových aberací.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky se rozpustí ve fyziologickém roztoku. Pokud jsou v něm nerozpustné, rozpustí se nebo suspendují ve vhodném vehikulu.

Používají se čerstvě připravené roztoky testované látky. Použije-li se pro usnadnění dávkování vehikulum, nesmí ani reagovat s testovanou látkou, ani působit toxicky.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Používají se hlodavci, např. potkani, myši nebo činští křečci. Zdravá dospělá zvířata v mladém věku se náhodně rozdělí do exponovaných a kontrolních skupin.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

V každé experimentální i kontrolní skupině se používá nejméně pět samic a pět samců. Pokud plán experimentu předpokládá více intervalů zpracování po expozici, je třeba použít 10 zvířat na každý interval zpracování a skupinu.

Pro skupinu pozitivní kontroly postačuje jeden časový interval zpracování buněk.

###### 1.2.2.3 Způsob aplikace

Obvykle by se měly testované látky aplikovat jen jednou. Na základě toxikologických informací jsou možné opakované aplikace. Jsou však na místě jen tam, kde testovaná látka nemá žádné cytotoxické účinky na buňky kostní dřeně. Obvyklými způsoby aplikace jsou orální aplikace nebo intraperitoneální injekce. Podle potřeby jsou vhodné i jiné způsoby aplikace.

#### 1.2.2.4 Negativní a pozitivní kontroly

Pro pozitivní kontrolu se používá látka, o které je známo, že způsobuje *in vivo* chromozomové aberace. Negativní kontrolní skupina (s rozpouštědlem) tvoří rovněž součást každého experimentu.

#### 1.2.2.5 Volba dávek

V základním kroku se používá jedna dávka testované látky. Jde o maximální tolerovanou dávku nebo takovou dávku, která vyvolává určité příznaky cytotoxicity, např. částečnou inhibici mitózy.

Maximální (limitní) dávka u „netoxických“ sloučenin, jež efekt po jednorázové aplikaci musí být zhodnocen, je  $2\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti.

Jestliže se použije opakování dávkování, limitní dávka je  $1000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti a den.

Je možno zvolit další dávky, je-li pro to vědecký podklad.

Pokud test slouží jako verifikační metoda, měla by se použít nejméně dvě další dávkování.

#### 1.2.3 Popis postupu

Test může být proveden dvěma různými způsoby:

(a) Zvířatům se jednou aplikuje maximální tolerovaná dávka. Buňky jsou odebírány 24 h po aplikaci. Jestliže výsledky jsou v této fázi jasně pozitivní, další odběr buněk není nutný. Jestliže však výsledky jsou negativní, nebo pochybné, zvolí se dva časové intervaly odběru buněk v rozmezí 6 - 48 h, aby testovanou látkou byl ovlivněn celý buněčný cyklus.

Jestliže jsou použity další úrovně dávek, zpracování by se mělo provést v nejcitlivějším časovém intervalu a pokud není znám, pak 24 h po aplikaci.

(b) Pokud z informací o farmakokinetice a metabolismu vyplývá, že jsou vhodné opakování aplikace, jsou možné. Zvířata by se pak měla usmrtit 6 a 24 hodin po poslední aplikaci.

#### Zpracování kostní dřeně

Před usmrcením zvířat se jim intraperitoneálně vstříkne vhodná dávka mitotického jedu, aby se získal dostatečně velký počet buněk, které jsou v C-metafázi. Kostní dřeň se získá vypláchnutím izotonickým roztokem z obou stehenních kostí zvířat, která byla usmrcena bezprostředně předtím. Po vhodném hypotonickém zpracování se buňky fixují, nakapou na sklíčko a po vysušení na vzduchu se obarví.

#### Analyza

Podložní sklíčka se před mikroskopickou analýzou zakódují. Na jedno zvíře se vyšetřuje na strukturální chromozomové aberace nejméně 50 dobře rozprostřených metafází s úplným počtem centromer. Mimoto je možno pro každé zvíře stanovit mitotický index.

Údaje se shrnou do tabulky. Chromatidové a izochromatidové aberace (gapy, zlomy, výměny), a mitotické indexy, pokud byly zjištěny, se uvedou samostatně pro všechna exponovaná i kontrolní zvířata. Mimoto je třeba pro každou experimentální i kontrolní skupinu uvést průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Údaje se vyhodnotí pomocí vhodných statistických metod.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- druh, kmen a stáří použitých zvířat,
- počet zvířat (samců/samic) v experimentálních a kontrolních skupinách,
- experimentální podmínky: detailní popis expozice resp. odběr vzorků, dávkování, trvání expozice, použitý mitotický jed a jeho koncentrace,
- počet analyzovaných metafází na jedno zvíře,
- mitotický index, pokud je znám,
- druh a počet aberací samostatně pro exponovaná a kontrolní zvířata,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse výsledků,
- vyhodnocení výsledků.

## B.12. MUTAGENITA (MICRONUCLEUS TEST)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Mikronukleus test je krátkodobý test pro důkaz poškození chromozomů nebo poškození dělicího aparátu chemickými látkami *in vivo*. Základem této metody je zvýšený výskyt mikrojader v polychromatických erytrocytech exponovaných zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Mikrojádra se tvoří z fragmentů chromozomů nebo celých chromozómů opožděných v mitóze. Při vývoji erytrocytů z erytroblastů je jádro vytlačeno, zatímco mikronukleus může zůstat v cytoplasmě. V tomto testu se proto vyhodnocují mladé polychromní erytrocyty z kostní dřeně laboratorních savců, kterým byla vhodnou cestou aplikována testovaná látka. Kostní dřeň se vypláchně ze stehenních kostí zvířat, zhotoví se nátery a obarví se. Mikroskopicky se zjišťuje počet mikrojader v polychromních erytrocytech a mimoto se stanoví poměr polychromních erytrocytů k normochromním.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky se rozpustí v isotonickém roztoku. Pokud jsou v něm nerozpustné, rozpustí se nebo se suspendují ve vhodném vehikulu. Použije-li se vehikulum, nesmí ani reagovat s testovanou látkou, ani působit toxicky. Obvykle se používají čerstvě připravené roztoky testované látky.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Doporučuje se používat myši, je však možno používat i jiné savce. Zdravá dospělá zvířata v mladém věku se náhodně rozdělí do exponovaných a kontrolních skupin.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

V každé experimentální i kontrolní skupině se používá nejméně pět samic a pět samců. Pokud plán experimentu předpokládá více intervalů zpracování po expozici, je třeba použít 10 zvířat na každý interval zpracování a skupinu. Pro skupinu pozitivní kontroly postačuje jeden časový interval zpracování buněk.

###### 1.2.2.3 Způsob aplikace

Obvykle by se měly testované látky aplikovat jen jednou. Na základě toxikologických informací jsou možné opakování aplikace. Jsou však na místě jen tam, kde testovaná látka nemá žádné cytotoxické účinky na buňky kostní dřeně. Obvyklými způsoby aplikace jsou orální aplikace nebo intraperitoneální injekce. Podle potřeby jsou vhodné i jiné způsoby aplikace.

#### 1.2.2.4 Negativní a pozitivní kontroly

Při každém experimentu se používají jak pozitivní, tak negativní (s rozpuštědlem) kontroly.

#### 1.2.2.5 Volba dávek

V základním kroku se používá jedna dávka testované látky. Jde o maximální tolerovanou dávku nebo takovou dávku, která vyvolává určité příznaky cytotoxicity, např. změnu v poměru polychromních a normochromních erytrocytů

Maximální (limitní) dávka u „netoxických“ sloučenin, ježíž efekt po jednorázové aplikaci musí být zhodnocen, je  $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti.

Jestliže se použije opakované dávkování, limitní dávka je  $1000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti a den.

Je možno zvolit další dávky, je-li pro to vědecký podklad.

Pokud test slouží jako verifikační metoda, měla by se použít nejméně dvě další dávkování.

#### 1.2.3 Popis postupu

Test může probíhat dvěma různými způsoby:

(a) Zvířata jsou exponována testované látce jednou. Zpracování by se mělo provést v okamžiku nejvyšší četnosti mikrojader, který se však může lišit u různých láttek. Proto je kostní dřeň odebírána nejméně ve dvou intervalech ne však dříve než 12 h a ne později než 48 h po aplikaci testované látky.

Jestliže jsou použity další úrovně dávek, zpracování by se mělo provést v nejcitlivějším okamžiku a pokud není znám, pak 24 h po aplikaci.

(b) Pokud z informací o farmakokinetice a metabolismu vyplývá, že jsou vhodné opakované aplikace, je možné je použít. Zvířata by se pak měla usmrtit v jednom intervalu ne dříve, než 12 h po poslední aplikaci.

#### Zpracování kostní dřeně

Kostní dřeň se získá vypláchnutím bovinním sérem z obou stehenních kostí zvířat, která byla usmrcena bezprostředně předtím. Sedimentace buněk se provádí centrifugováním, supernatant se odstraní. Kapky homogenní buněčné suspenze se nanesou na podložní skličko, připraví se nátěry a po vysušení na vzduchu se obarví.

#### Analyza

Podložní sklička se před mikroskopickou analýzou zakódují. Na jedno zvíře se pro stanovení četnosti mikronukleů analyzuje nejméně 1000 polychromních erytrocytů.

Poměr normochromních erytrocytů k polychromním se stanoví pro každé jednotlivé zvíře z 1000 erytrocytů.

## 2.

#### ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky. Počet vyhodnocených polychromních erytrocytů, počet polychromních erytrocytů s mikronukley, procento buněk s mikronukley a poměr normochromních a polychromních erytrocytů se uvedou samostatně pro všechna exponovaná zvířata i pro kontrolní zvířata. Mimo to je třeba pro každou

experimentální i kontrolní skupinu uvést průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Údaje se vyhodnotí pomocí vhodných statistických metod.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- druh, kmen a stáří použitých zvířat,
- počet zvířat (samců/samic) v experimentálních a kontrolních skupinách,
- experimentální podmínky: detailní popis expozice a odběru vzorků, dávkování, údaje o toxicitě, o negativních a pozitivních kontrolách,
- kritéria pro klasifikaci mikronukleů,
- vztah dávka-účinek, je-li to možné
- statistické vyhodnocení,
- diskuse výsledků,
- vyhodnocení výsledků.

## B.13. MUTAGENITA (ESCHERICHIA COLI - TEST ZPĚTNÉ MUTACE)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Reverzní systém na tryptofanu (*trp*) závislých kmenů *E. coli* je mikrobiální test, v němž se měří změna  $trp^- \rightarrow trp^+$  indukovaná chemickými látkami, které způsobují záměny bazi v genomu organismu.

Bakterie se vystaví působení testované látky s přídavkem a bez přídavku systému metabolické aktivace. Po přiměřené inkubační době na minimálním médiu se spočítají kolonie revertant a porovnají s počtem spontánních revertujících buněk v neovlivněné kontrolní kultuře a v kontrolní kultuře s přídavkem pouze rozpouštědla.

#### 1.2 Popis metody

K provedení experimentu je možno použít dvou metod:

(1) metody s předinkubací

(2) přímý miskový test; při něm se smísí bakterie a testovaná látka s vrchním agarem a vylije se na povrch Petriho misky se selektivním médiem.

#### 1.2.1 Příprava

##### 1.2.1.1 Bakterie

Bakterie se kultivují při 37 °C do pozdní exponenciální, resp. do časně stacionární fáze. Hustota buněk má činit asi  $10^8 - 10^9$  na 1 ml.

##### 1.2.1.2 Metabolická aktivace

Bakterie mají být vystaveny působení testované látky jak s přídavkem, tak i bez přídavku vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji užívaný systém je postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců po aplikaci látek indukujících enzymy a doplněná kofaktory.

#### 1.2.2 Experimentální podmínky

##### 1.2.2.1 Testovací kmény

Používají se tři kmény - WP2, WP2 uvr A a WP2 uvr A pKM 101. Je nezbytné používat standardizované metody kultivace a uchovávání kultur kmenů. Je třeba kontrolovat podmínky růstu a genetické vlastnosti kmenů, jejich citlivost vůči ultrafialovému záření a mitomycinu C a rezistenci kmene WP2 uvr A pKM 101 vůči ampicilinu. Počet spontánních revertant má být pro všechny kmény v rozmezí očekávaného rozptylu.

##### 1.2.2.2 Média

Pro růst a selekci mutantů se používá vhodné selektivní médium společně s vhodným vrchním agarem.

#### 1.2.2.3 Negativní a pozitivní kontroly

Je nutno současně nasadit jak neexponované kultury, tak kultury doplněné rozpouštědly. Pozitivní kontroly je nutno provádět pro tyto dva účely:

a) Potvrzení citlivosti bakteriálních kmenů. Pro testy bez metabolické aktivace je možno jako pozitivní kontroly používat metylmetansulfonát, 4-nitrochinolinoxid nebo etylnitrosomočovinu.

b) Důkaz aktivity odpovídajícího metabolického aktivačního systému. Jako pozitivní kontrolní látka je pro ověření metabolické aktivity pro všechny kmeny vhodný 2-aminoantracen. Pokud je to možné, měla by se pozitivní kontrola provést s látkou, která patří ke stejné třídě chemických látek jako testovaná látka.

#### 1.2.2.4 Koncentrace testované látky na jednu misku

Použije se nejméně pět různých koncentrací testované látky, které se od sebe liší o semilogaritmické rozdíly. Látky se zkoušejí až po mez rozpustnosti resp. toxicity. Toxicita se prokáže snížením počtu spontánních revertantů, sníženým růstem pozadí nebo na základě přežívání bakterií v exponovaných kulturách. Netoxické látky je třeba testovat až do koncentrace 5 mg/misku, než je možno je považovat za negativní.

#### 1.2.2.5 Podmínky inkubace

Inkubace misek se provádí při 37 °C 48 až 72 hodin.

#### 1.2.3 Popis postupu

Při přímém miskovém testu bez metabolické aktivace se přidá testovaná látka a 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury k 2,0 ml vrchního agaru. Při testech s metabolickou aktivací se po přidání testované látky a bakterií k vrchnímu agaru přidá 0,5 ml aktivační směsi s vhodným množstvím postmitochondriální frakce. Obsah každé zkumavky se promísi a vylije na povrch misky se selektivním médiem. Po ztuhnutí vrchního agaru se misky inkubují při 37 °C 48 až 72 hodin. Po uplynutí inkubační doby se spočítají revertantní kolonie na misku.

Při metodě s předinkubací se připraví směs z testované látky, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury a vhodného množství aktivační směsi nebo stejného množství tlumivého roztoku a určitou dobu se inkubuje, než se přidá 2,0 ml vrchního agaru. Další průběh se neliší od miskové metody.

U obou metod je nutno použít nejméně tří misek na jednu koncentraci.

## 2. ÚDAJE

Uvedou se počty revertantních kolonií na misku jak pro kontrolní sérii, tak pro sérii s testovanou látkou. Je třeba uvést jednotlivé i průměrné hodnoty revertantů na misku a směrodatné odchylky jak pro testovanou látku, tak pro kontrolní stanovení.

Údaje se vyhodnotí pomocí vhodných statistických metod.

Je třeba provést nejméně dva nezávislé pokusy. Není nutné, aby druhý pokus proběhl identicky s prvním experimentem. Může být výhodné změnit určité podmínky testu a získat tak další důležité údaje.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace :

- bakterie a použité kmeny;

- experimentální podmínky: koncentrace, toxicita, složení médií, metodika (preinkubace - inkubace), metabolický aktivační systém, referenční látky, negativní kontroly;

- počet kolonií na misku, průměrná hodnota revertant na misku, směrodatná odchylka, vztah dávka-účinek, pokud je to možné;

- diskuse výsledků;

- vyhodnocení výsledků.

## B.14. MUTAGENITA (SALMONELLA TYPHIMURIUM - TEST ZPĚTNÉ MUTACE)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Reverzní systém na histidinu (*his*) závislých kmenů *Salmonella typhimurium* je mikrobiální test, ve kterém se měří změna *his*<sup>-</sup> → *his*<sup>+</sup> indukovaná chemickými látkami typu záměny bazi nebo posunových mutací v genomu organismu.

Bakterie se vystaví působení testované látky s přídavkem a bez přídavku metabolického aktivačního systému a nanesou se na minimální médium. Po přiměřené inkubační době se spočítají kolonie revertovaných buněk a porovnají s počtem spontánních revertant v neexponované kontrolní kultuře a v kontrolní kultuře s přídavkem pouze rozpouštědla.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

###### 1.2.1.1 Bakterie

Čerstvě připravené bakteriální kultury se kultivují při 37 °C do pozdní exponenciální, resp. do časné stacionární fáze růstu. Hustota buněk má činit asi  $10^8$  -  $10^9$  buněk na ml.

###### 1.2.1.2 Metabolická aktivace

Bakterie mají být vystaveny působení testované látky jak s přídavkem, tak i bez přídavku vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji užívaný systém je postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců po aplikaci látek indukujících enzymy a doplněná kofaktory.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Testovací kmeny

Je třeba použít nejméně čtyři kmeny - TA 1535, TA 1537 nebo TA 97, TA 98 a TA 100. Doplňkově je možno používat další kmeny jako TA 1538 a TA 102. Je nezbytné používat jednotné metody kultivace a uchovávání kultur kmenů. Musí být kontrolovány podmínky růstu a genetické vlastnosti kmenů, jejich citlivost vůči ultrafialovému záření a krystalové violeti a jejich rezistenci vůči ampicilinu. Počet spontánních revertant se má pohybovat pro všechny kmeny v rozmezí očekávaného rozptylu.

###### 1.2.2.2 Média

Je třeba používat vhodné selektivní médium v kombinaci s vhodným vrchním agarem.

### 1.2.2.3 Negativní a pozitivní kontroly

Je nutno současně nasadit jak neexponované kultury, tak kontrolní kultury exponované rozpouštědlem.

Pozitivní kontroly je nutno provádět pro tyto dva účely:

a) Potvrzení citlivosti bakteriálních kmenů. Pro testy bez metabolické aktivace je možno používat tyto látky:

Kmen	Látka používaná pro reverzi
TA 1535, TA 100	azid sodný
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoren
TA 1537	9-aminoakridin
TA 102	kumenhydroperoxid

b) Důkaz aktivity vhodného metabolizujícího systému. Jako pozitivní kontrolní látka je pro ověření metabolické aktivity pro všechny kmeny vhodný 2-aminoantracen. Pokud je to možné, měla by se pozitivní kontrola provést s látkou, která patří ke stejné třídě chemických látek jako testovaná látka.

### 1.2.2.4 Koncentrace testované látky na jednu misku

Použije se nejméně pět různých koncentrací testované látky, které se od sebe liší o semilogaritmické rozdíly. Látky se zkoušejí až po mez rozpustnosti resp. toxicity. Toxicita se prokáže snížením počtu spontánních revertantů, sníženým růstem pozadí nebo podle přežívání bakterií v exponovaných kulturách. Netoxické látky je třeba zkoušet až do koncentrace 5 mg/misku, než je možno je považovat za negativní.

### 1.2.2.5 Podmínky inkubace

Inkubace misek se provádí při 37 °C 48 až 72 hodin.

### 1.2.3 Popis postupu

Při přímém miskovém testu bez metabolické aktivace se přidá testovaná látka a 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury k 2,0 ml vrchního agaru. Při testech s metabolickou aktivací se po přidání testované látky a bakterii k vrchnímu agaru přidá 0,5 ml aktivační směsi s vhodným množstvím postmitochondriální frakce. Obsah každé zkumavky se promísi a vylije na povrch misky se selektivním médiem. Po ztuhnutí vrchního agaru se misky inkubují při 37 °C 48 až 72 hodiny. Po uplynutí inkubační doby se spočítají revertantní kolonie na misce. Při metodě s předinkubací se připraví směs sledované látky, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury, vhodného množství aktivační směsi nebo stejného množství tlumivého roztoku a předběžně se inkubuje, načež se přidá 2,0 ml vrchního agaru. Další průběh se neliší od miskové metody.

U obou metod je nutno použít nejméně tří misek na jednu koncentraci.

## 2. ÚDAJE

Uvedou se počty revertantních kolonií na misku jak pro kontrolní sérii, tak pro sérii s testovanou látkou.

Je třeba uvést jednotlivé i průměrné hodnoty revertantních kolonií na misku a směrodatné odchylky jak pro testovanou látku, tak pro kontrolní stanovení.

Údaje se vyhodnotí pomocí vhodných statistických metod.

Je třeba provést nejméně dva nezávislé pokusy. Není nutné, aby druhý pokus proběhl identicky s prvním experimentem. Může být výhodné změnit určité podmínky testu a získat tak další důležité údaje.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje pokud možno tyto informace:

- bakterie a použitý kmen,

- experimentální podmínky: koncentrace, toxicita, složení médií, metody (preinkubace - inkubace), metabolický aktivační systém, referenční látky, negativní kontroly,

- počet kolonií na misku, průměrná hodnota revertantních kolonií na misku, směrodatná odchylka, vztah dávka-účinek, pokud je to možné,

- diskuse výsledků,

- vyhodnocení výsledků.

## B.15 GENOVÉ MUTACE - SACCHAROMYCES CEREVISIAE

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Různé haploidní a diploidní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* mohou být užity pro určení produkce genových mutací indukovaných chemickými látkami bez a s metabolickou aktivací.

Jsou využívány forward mutační systémy u haploidních kmenů, jako je mírovznikumutací z červených, adenin vyžadujících mutant (*ade-1*, *ade-2*) na dvojitě, adenin vyžadující bílé mutanty a selektivní systémy jako je indukce resistance ke canavaninu a cykloheximidu.

Nejlépe ověřený reversní mutační systém zahrnuje využití haploidního kmene XV 185-14C s okrovými (ochre) nonsense mutacemi *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* a *trp 5-48*. Mutace jsou vratné působením mutagenů typu záměny bazí, které indukuji mutace ve specifickém místě, nebo okrové supresorové mutace. XV185-14C nese rovněž *his 1-7* marker, missense mutaci, revertovanou převážně mutacemi v dalším místě a marker *hom 3-10*, který je revertován posunovými mutageny.

U diploidních kmenů *S. cerevisiae* je jediným široce využívaným kmenem *D<sub>7</sub>*, který je homozygotní pro *ilv 1-92*.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Roztoky testovaných látok a kontrol mají být připraveny těsně před testováním za použití vhodného vehikula. U organických látok ve vodě nerozpustných se nemá užít roztok vyšší než 2 objemová % v organických rozpouštědlech jako je etanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Finální koncentrace vehikula nemá významně ovlivnit životnost a charakteristiky růstu.

##### Metabolická aktivace

Buňky mají být exponovány testovaným látkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

Nejčastěji užívaným systémem je postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců po aplikaci látok indukujících enzymy a doplněná kofaktory. Užití jiných druhů, tkání, postmitochondriálních frakcí či postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Testovací kmeny

Haploidní kmen XV 185-14C a diploidní kmen *D<sub>7</sub>* jsou nejužívanější pro studie genových mutací. Jiné kmeny mohou být rovněž vhodné.

#### 1.2.2.2 *Media*

Odpovídající kultivační media jsou užívána pro určení počtu přežívajících a mutovaných buněk.

#### 1.2.2.3 *Negativní a positivní kontroly*

Positivní, neovlivněné a rozpouštědlem ovlivněné kontroly jsou používány současně. Pro každou specifickou mutační změnu mají být použity odpovídající positivní kontrolní chemické látky.

#### 1.2.2.4 *Koncentrace*

Má být použito nejméně 5 vhodně zvolených koncentrací. U toxickech látek nemá nejvyšší použitá koncentrace režukovat přežití pod 5 - 10 %. Látky ve vodě relativně nerozpustné mají být testovány až po mez rozpustnosti látky za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace pro látky netoxicke, ve vodě rozpustné, je určena případ od případu.

#### 1.2.2.5 *Kultivační podmínky*

Misky jsou inkubovány po sedm dní při 28 až 30 °C ve tmě.

#### 1.2.2.6 *Frekvence spontánnich mutací*

Frekvence spontánních mutací u subkultur má být v rozmezí akceptovaných normálních hodnot.

#### 1.2.2.7 *Počet replikaci*

Je nutno použít nejméně tří misek na jednu koncentraci u testu s prototrofními buňkami a u životnosti buněk. U experimentů užívajících markery jako *hom* 3-10 s nízkou mutační rychlostí musí být počet misek zvýšen, aby byly získány statisticky relevantní údaje.

#### 1.2.3 *Popis postupu*

Ovlivnění kmenů *S. cerevisiae* je obvykle prováděno ve zkumavce v tekutém prostředí a zahrnuje buď stacionární nebo rostoucí buňky. Základní pokusy mají být provedeny na rostoucích buňkách:  $1-5 \times 10^7$  buněk/ml je vystaveno testované látce po dobu až 18 h při 28 až 30 °C za třepání. Odpovídající množství metabolického aktivačního systému je přidáno v průběhu ovlivnění, pokud je to potřebné. Po skončení ovlivnění jsou buňky centrifugovány, promyty a vyočkovány na vhodné kultivační medium. Po inkubaci jsou počítány přežívající buňky a buňky s indukcí genových mutací.

Jestliže je první pokus negativní, má být proveden druhý pokus s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první pokus pozitivní, je potvrzen dalším vhodným nezávislým experimentem.

## 2. ÚDAJE

Údaje mají být presentovány v tabulkové formě a zahrnují počet kolonii, počet mutant, přežívajících buněk a frekvenci mutací. Všechny výsledky mají být potvrzeny nezávislým experimentem. Údaje mají být vyhodnoceny vhodnými statistickými metodami.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje informace o:

- použitých kmenech,
- podmínkách testu: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí, složení medií, teplota a trvání inkubace, metabolický aktivační systém,
- podmínkách vlastního experimentu: hladina expozice, postup a trvání ovlivnění, teplota při ovlivnění, pozitivní a negativní kontroly,
- počtu kolonií, počtu mutant, přežívajících buněk a frekvenci mutací, vztahu dávky a účinku, pokud je to možné,
- diskusi výsledků,
- vyhodnocení výsledků.

## B.16 MITOTICKÁ REKOMBINAČE - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Mitotická rekombinace u *Saccharomyces cerevisiae* může být detekována mezi geny (obecněji mezi genem a jeho centromerou) a uvnitř genů. První případ je nazýván mitotické překřížení a vytváří reciproční produkty, kdežto druhý případ je většinou nereciproční a je nazýván genová konverse. Překřížení je obecně testováno na základě tvorby recessivních homozygotních kolonií nebo sektorů vzniklých u heterozygotních kmenů, genová konverse je testována na základě tvorby prototrofních revertant vzniklých u auxotrofního heteroalelického kmena, který nese dvě různé defektní alely téhož genu. Nejčastěji užívané kmeny pro detekci mitotické genové konverze jsou D<sub>4</sub> (heteroalelický v *ade 2 a trp 5*), D<sub>7</sub> (heteroalelický v *trp 5*), BZ<sub>34</sub> (heteroalelický v *arg 4*) a JD1 (heteroalelický v *his 4 a trp 5*). Mitotické překřížení produkovající červené a růžové sektory může být testováno u D<sub>5</sub> nebo D<sub>7</sub> (který rovněž měří mitotickou genovou konversi a reversní mutaci v *ilv 1-92*). Oba kmeny jsou heteroalelické pro komplementární alely *ade 2*.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Roztoky testovaných látek a kontrol mají být připraveny těsně před testováním za použití vhodného vehikula. U organických látek ve vodě neropustných se nemá užít roztok vyšší než 2 objemová % v organických rozpouštědlech jako je etanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Finální koncentrace vehikula nemá významně ovlivnit životnost a charakteristiky růstu.

##### Metabolická aktivace

Buňky mají být vystaveny působení testovaných látek jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného exogenního metabolického aktivaciálního systému. Nejčastěji užívaným systémem je postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců po aplikaci látek indukujících enzymy a doplněná kofaktory. Užití jiných druhů, tkání, postmitochoondriálních frakcí či postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Testovací kmeny

Nejužívanější jsou diploidní kmeny D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>7</sub> a JD1. Užití jiných kmenů může být rovněž vhodné.

###### 1.2.2.2 Media

Odpovídající kultivační media jsou užívána pro určení přežívajících buněk a frekvenci mitotické rekombinace

#### 1.2.2.3 Negativní a pozitivní kontroly

Positivní, neovlivněné a rozpouštědlem ovlivněné kontroly jsou používány současně. Pro každou specifickou mutační změnu mají být použity odpovídající pozitivní kontrolní chemické látky.

#### 1.2.2.4 Koncentrace

Má být použito nejméně 5 vhodně zvolených koncentrací. Musí být brán ohled na cytotoxicitu a rozpustnost. Nejnižší koncentrace nesmí mít vliv na životnost buněk. U toxicických látek nemá nejvyšší použitá koncentrace redukovat přežití pod 5 - 10 %. Látky ve vodě relativně nerozpustné mají být testovány až po mez rozpustnosti látky za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace pro látky netoxické, ve vodě rozpustné, je určena případ od případu.

Buňky mohou být vystaveny působení testované látky buď ve stacionární fázi nebo během růstu po dobu až 18 h. Kultury dlouhodobě ovlivňované mají být mikroskopicky kontrolovány pro tvorbu spor, jejichž přítomnost test znehodnocuje.

#### 1.2.2.5 Podmínky inkubace

Misky jsou inkubovány ve tmě po čtyři až sedm dní při 28-30 °C. Misky použité pro průkaz červených a růžových sektorů tvořených mitotickým překřížením mají být umístěny v chladničce (cca 4 °C) po další 1 - 2 dny před počítáním, aby se mohly utvořit odpovídající pigmentované kolonie.

#### 1.2.2.6 Spontánní frekvence mitotické rekombinace

Mají být užity subkultury s frekvencí spontánních mutací v rozmezí akceptovaných normálních hodnot.

#### 1.2.2.7 Počet replikaci

Je nutno použít nejméně tří misek na jednu koncentraci u testu prototrofních buněk tvořených mitotickou genovou konversí a pro určení životnosti buněk. V případě testování recessivní homozygosity tvořené mitotickým překřížením má být počet misek zvýšen, aby bylo dosaženo dostatečného počtu kolonií.

#### 1.2.2.8 Postup

Ovlivnění *S. cerevisiae* probíhá obvykle jako zkumavkový test v tekutém prostředí a zahrnuje buď stacionární nebo rostoucí buňky. Základní pokusy mají být provedeny na rostoucích buňkách.  $1-5 \times 10^7$  buněk/ml je vystaveno testované látce po dobu až 18 h při 28 až 30 °C za třepání. Odpovídající množství metabolického aktivačního systému je přidáno v průběhu ovlivnění, pokud je to potřebné.

Po skončení ovlivnění jsou buňky centrifugovány, promyty a vyočkovány na vhodné kultivační medium. Po inkubaci jsou počítány přeživající buňky a buňky s indukcí mitotické rekombinace.

Jestliže je první pokus negativní, má být proveden druhý pokus s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první pokus pozitivní, je potvrzen dalším vhodným nezávislým experimentem.

## 2. ÚDAJE

Údaje mají být presentovány v tabulkové formě a zahrnují počet kolonií, počet rekombinací, přežívajících buněk a frekvenci rekombinaci.

Výsledky mají být potvrzeny v nezávislém experimentu.

Údaje mají být vyhodnoceny vhodnými statistickými metodami.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má, pokud možno, obsahovat následující informace:

- použité kmeny,
- podmínky testu: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí, složení medii, teplota a trvání inkubace, metabolický aktivační systém,
- podmínky vlastního experimentu: hladina expozice, postup a trvání ovlivnění, teplota při ovlivnění, pozitivní a negativní kontroly,
- počet kolonií, počet rekombinant, přežívajících buněk a frekvence rekombinaci, vztah dávky a účinku, pokud je to možné, statistické hodnocení dat,
- diskusi výsledků,
- vyhodnocení výsledků.

## B.17 "IN VITRO" TEST NA GENOVÉ MUTACE V SAVČÍCH BUŇKÁCH

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Buněčné kultury savčích buněk mohou být použity k detekci mutací indukovaných chemickými látkami. Nejširší použití mají buněčné linie včetně myších lymfomových buněk L5178Y, CHO a V-79 linie buněk čínského křečka. V těchto buněčných liniích jsou nejčastěji užívanými systémy detekce mutací v lokusech thymidin kinasy (TK), hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferasy (HPRT), (dříve HGPRT) a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasy. Systémy TK a HPRT detekují mutace párování basí, frameshift mutace a malé delece. Systém  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  detekuje pouze mutace párování basí.

Buňky s deficiencí thymidin kinasy (TK), vyvolanou forward mutací  $\text{TK}^+ - \text{TK}^-$ , jsou resistantní k bromodeoxyuridinu (BrDU), fluorodeoxyuridinu (FdU) nebo trifluorothymidinu (TFT), protože tyto antimetabolity nejsou inkorporovány do buněčných nukleotidů "salvage" enzymatickým systémem thymidin kinasy. Nukleotidy potřebné pro buněčný metabolismus jsou získávány výhradně syntézou *de novo*. Jestliže v přítomnosti thymidin kinasy jsou BrDU, FdU, nebo TFT inkorporovány do nukleotidů, je výsledkem inhibice buněčného metabolismu a cytotoxický efekt. Proto jsou mutované buňky schopné proliferace v přítomnosti BrDU, FdU, nebo TFT, zatímco normální buňky obsahující thymidin kinasu nejsou proliferace schopny. Podobně buňky s deficiencí HPRT jsou selektivně resistantní k 8-azaguaninu (AG) nebo k 6-thioguaninu (TG). Buňky s alterací  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasy jsou selektivně resistantní k ouabainu.

Cytotoxicita je stanovena měřením účinku testovaného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (cloning efficiency) nebo rychlosti růstu kultury. Frekvence mutací je určována inokulací známého počtu buněk jak do média obsahujícího selektivní látky k detekci mutovaných buněk, tak do média bez selektivních látek k určení počtu přežívajících buněk. Po ukončení kultivace jsou počítány kolonie. Frekvence mutací je určována z počtu kolonií mutovaných buněk korigovaného počtem přežívajících buněk.

#### 1.2 Kriteria kvality

Žádná.

#### 1.3 Popis metody

##### 1.3.1 Příprava

###### 1.3.1.1 Buňky

Pro tento test je dostupná řada buněčných linií. Patří mezi ně sublinie L5178Y, buňky čínského křečka CHO, nebo V-79 s výraznou citlivostí k chemickým mutagenům, s vysokou schopností vytvářet kolonie (cloning efficiency) a s nízkou frekvencí spontánních mutací. U buněk musí být pravidelně kontrolovaná stabilita

karyotypu a měly by být kontrolovaný z hlediska kontaminace *Mycoplasmaty*. Ostatní typy buněk mohou být použity pouze s podmínkou, že oprávněnost jejich použití jako testu pro chemicky indukované genové mutace je plně prokázána.

#### 1.3.1.2 *Médium*

Musí být použita vhodná kultivační média a dodrženy vhodné kultivační podmínky (teplota, kultivační nádoby, koncentrace CO<sub>2</sub> a vlhkost). Média a séra musí být vybrána s ohledem na selektivní systém a typ buněk použitých v testu.

#### 1.3.1.3 *Testovaná látka*

Testované látky se rozpustí, nebo suspendují v kultivačním médiu nebo ve vhodném rozpouštědle. Konečná koncentrace rozpouštědla v kultuře nesmí nepříznivě ovlivňovat životnost buněk nebo rychlosť růstu.

#### 1.3.1.4 *Metabolický aktivační systém*

Buňky musí být exponovány testované látce jak v přítomnosti, tak i bez použití exogenního savčího metabolického aktivačního systému. Připouští se použití buněčných typů s vnitřní (vlastní) metabolickou aktivitou, jestliže úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro testovanou skupinu chemických láték.

### 1.3.2 Experimentální podmínky

#### 1.3.2.1 *Negativní a pozitivní kontroly*

Do každého experimentu musí být zařazeny pozitivní kontroly zahrnující jak přímo působící látky, tak látky vyžadující metabolickou aktivaci. Zároveň musí být také použity negativní kontroly (s rozpouštědlem).

Dále jsou uvedeny příklady láték, které mohou být použity jako pozitivní kontroly:

- přímo působící látky: etylmetansulfonát, hykanthon,
- nepřímo působící látky (vyžadující metabolickou aktivaci) : 2-acetylaminofluoren, 7,12-dimetylbenzantracen, N-nitrosodimethylamin.

Je-li to potřeba, zařazuje se dodatečná pozitivní kontrola ze stejné chemické skupiny, jako je testovaná látka.

#### 1.3.2.2 *Koncentrace*

Musí být použito několik koncentrací testované látky. Tyto koncentrace musí vyvolávat toxický efekt závislý na koncentraci, nejvyšší koncentrace indukuje nízkou úroveň přežívajících buněk a počet přežívajících buněk v nejnižší koncentraci má být přibližně stejný jako v negativní kontrole.

Látky ve vodě špatně rozpustné musí být testovány v koncentracích až na hranici rozpustnosti za použití vhodných postupů. Pro netoxické látky ve vodě dobře rozpustné se nejvyšší koncentrace testované látky určuje případ od případu.

### 1.3.3 *Vlastní experiment*

Počet buněk použitých pro jednu kulturu musí být odvozen od spontánní frekvence mutací. Obvykle se používá počet živých buněk, který je 10ti násobkem převrácené hodnoty frekvence spontánních mutací.

Buňky musí být exponovány dostatečnou dobu, ve většině případů postačuje délka expozice v délce 2 - 5 hodin. Buňky bez dostatečné vlastní metabolické aktivity musí být exponovány testované látce společně jak s vhodným metabolickým systémem, tak i bez něho. Po ukončení expozice jsou buňky promyty čistým médiem bez testované látky a dále kultivovány, aby mohla být zhodnocena jejich viabilita a projev mutačního fenotypu.

Ke konci fáze exprese, která by měla být dostatečně dlouhá k vyvolání optimální fenotypické exprese indukovaných mutací, jsou buňky kultivovány v médiu s a bez selektivních látek ke zhodnocení počtu mutací a životnosti buněk.

Všechny výsledky musí být potvrzeny v nezávislých experimentech.

## 2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky. Počet mutací a přežívání buněk musí být vyjádřeno pro testovanou látku i pro kontroly a pro každou misku samostatně. Dále je třeba uvést průměrný počet kolonii na misku a směrodatnou odchylku. Frekvence mutací musí být vyjádřena jako počet mutantů na počet přežívajících buněk. Přežívání buněk a schopnost vytvářet kolonie (cloning efficiency) se vyjadřuje jako procento hodnot kontrolní skupiny.

Údaje musí být vyhodnoceny pomocí vhodných statistických metod.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje, je-li to možné, informace o:

- použité buněčné linii, počtu kultur v pokusu, metodách udržování buněčných kultur,
- podmínkách experimentu: složení média, koncentrace CO<sub>2</sub>, koncentrace testované látky, použité rozpouštědlo, kultivační teplota, délka kultivace, trvání fáze exprese (včetně počtu inokulovaných buněk a subkultur), trvání expozice, hustota buněk během expozice, druh použitého metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly, použité selektivní látky,
- zdůvodnění výběru koncentrací,
- metodě použití k výpočtu živých a mutovaných buněk,
- statistickém vyhodnocení,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## B.18 POŠKOZENÍ DNA REPARACE - NEPLÁNOVANÁ SYNTÉZA DNA - SAVČÍ BUŇKY IN VITRO

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Test neplánované syntézy DNA (UDS) umožňuje měřit reperační syntézu DNA po excizi a odstranění části DNA obsahující oblast poškození indukovaného chemickými, nebo fyzikálními faktory. Test je založen na inkorporaci značeného tymidinu ( $^3\text{H-TdR}$ ) do DNA savčích buněk, které nejsou v S fázi buněčného cyklu. Vzestup  $^3\text{H-TdR}$  je stanoven autoradiograficky, nebo kapalnou scintilační metodou (LSC) v exponovaných buňkách. Používají se primární buněčné kultury potkaních hepatocytů, které jsou exponovány testovanou látkou jak v přítomnosti tak i v nepřítomnosti exogenního metabolického aktivačního systému. UDS může být také stanovena v systému *in vivo*.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky a sloučeniny použité jako kontrolní, nebo referenční se rozpustí, nebo suspendují v kultivačním médiu, nebo ve vhodném rozpouštědle. Další ředění se provádí jenom kultivačním médiem. Konečná koncentrace rozpouštědla v kultuře nesmí nepříznivě ovlivňovat životnost buněk.

Používají se pouze primokultury potkaních hepatocytů, lidských lymfocytů, nebo stabilizovaných buněčných linií (lidské diploidní fibroblasty).

Buňky jsou exponovány testované látce v přítomnosti a nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Počet kultur

Pro každý experimentální bód je potřeba nejméně dvou buněčných kultur pro autoradiografiю a šesti kultur (nebo méně, je-li to vědecky zdůvodnitelné) pro LSC UDS.

###### 1.2.2.2 Negativní a pozitivní kontroly

V každém experimentu musí být současně zařazeny negativní a pozitivní kontroly v přítomnosti i v nepřítomnosti metabolického aktivačního systému.

Jako pozitivní kontrolu lze pro potkaní hepatocyty použít 7,12-dimethylbenz-anthracen (7,12-DMBA), nebo 2-acetylaminofluoren (2-AAF). Jako pozitivní kontrolu pro stabilizované buněčné linie jak pro autoradiografiю, tak i pro LSC bez metabolické aktivace lze použít 4-nitroquinolin-N-oxid (4-NQO). Jako pozitivní kontrolu při použití metabolického aktivačního systému lze použít N-dimethyl-nitrosamin.

#### 1.2.2.3 Koncentrace testované látky

Musí být použito několik koncentrací testované látky. Nejvyšší koncentrace musí vyvolávat toxicický efekt.

Látky ve vodě špatně rozpustné musí být testovány v koncentracích až na hranici rozpustnosti za použití vhodných postupů. Pro netoxicke látky ve vodě dobré rozpustné se nejvyšší koncentrace testované látky určuje případ od případu.

#### 1.2.2.4 Buňky

Pro udržování kultur musí být použito vhodné růstové médium, koncentrace CO<sub>2</sub>, teplota a vlhkost. Stabilizované buněčné linie musí být pravidelně kontrolovány na přítomnost *Mycoplasmat*.

#### 1.2.2.5 Metabolická aktivace

Pro primokultury hepatocytů se metabolický aktivační systém nepoužívá. Stabilizované buněčné linie a lymfocyty jsou exponovány testované látce v přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

### 1.2.3 Vlastní experiment

#### 1.2.3.1 Příprava kultur

Stabilizovaná buněčná linie se připravuje ze zásobní kultury (trypsinací nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), inkoluje se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubuje při 37 °C.

Krátkodobé kultury potkanných hepatocytů se připravují tak, že se umožní čerstvě isolovaným hepatocytům přichytit se ve vhodném médiu k povrchu kultivační nádoby.

Kultury lidských lymfocytů jsou založeny pomocí vhodné metody.

#### 1.2.3.2 Expozice kultur testované látce

Primární hepatocyty potkana. Čerstvě isolované hepatocyty potkana jsou exponovány testované látce v médiu obsahujícím <sup>3</sup>H-TdR po vhodnou dobu. Po ukončení expozice je médium odstraněno, buňky promyty, fixovány a sušeny. Sklíčka jsou ponořena do autoradiografické emulze (alternativně může být použit stripping film), exponována, vyvolána, obarvena a vyhodnocena.

Stabilizované buněčné linie a lymfocyty

*Autoradiografické techniky:* Buněčné kultury jsou exponovány testované látce po vhodnou dobu a pak jsou vystaveny působení <sup>3</sup>H-TdR. Doba působení je závislá na druhu testované látky, aktivitě metabolického systému a na typu buněk. K zachycení nejvyššího vrchołu UDS je třeba <sup>3</sup>H-TdR přidat současně s testovanou látkou, nebo několik minut po expozici. Výběr mezi těmito postupy je ovlivněn možnou interakcí mezi testovanou látkou a <sup>3</sup>H-TdR. K odlišení mezi UDS a semikonzervativní replikací DNA se užívá arginin deficientní médium, nízký obsah séra, nebo aplikace hydroxyurey do kultivačního média což způsobi inhibici semikonzervativní replikace DNA.

*Stanovení UDS pomocí LSC:* Před expozicí testované látce je třeba blokovat vstup buněk do S-fáze, jak bylo shora uvedeno. Buňky jsou pak exponovány testované

látce jak bylo popsáno pro autoradiografii. Na konci kultivace je DNA extrahována z buněk a stanoven celkový obsah DNA a určen rozsah inkorporace  $^3\text{H}$ -TdR.

Jestliže jsou použity ve shora uvedených metodách lidské lymfocyty, je v nestimulovaných kulturách suprese semikonzervativní replikace DNA zbytečná.

#### 1.2.4 Analýza

##### 1.2.4.1 Vyhodnocení autoradiografie

Při vyhodnocování UDS v buněčné kultuře se jádra v S-fázi nehodnotí. Hodnotí se nejméně 50 buněk v každém experimentálním bodě. Preparáty je třeba zakódovat před vyhodnocováním. V každém preparátu se hodnotí několik náhodně vybraných polí. Množství inkorporovaného  $^3\text{H}$ -TdR v cytoplasmě se určí v zóně o velikosti tří jader v cytoplasmě každé hodnocené buňky.

##### 1.2.4.2 Vyhodnocení LSC

Pro stanovení LSC UDS se použije přiměřený počet kultur pro každou koncentraci testované látky a pro kontroly.

Výsledky musí být potvrzeny v nezávislých experimentech.

### 2. ÚDAJE

Údaje musí být uvedeny v tabulkách.

#### 2.1 Vyhodnocení autoradiografie

Rozsah inkorporace  $^3\text{H}$ -TdR do cytoplasmy a počet zrn nalezených mimo buněčné jádro se zaznamenávají odděleně.

Rozsah inkorporace  $^3\text{H}$ -TdR do cytoplasmy a počet zrn v jádře je hodnocen pomocí průměru, mediánu a modu.

#### 2.2 Vyhodnocení LSC

Inkorporace  $^3\text{H}$ -TdR se zaznamenává jako dpm/ $\mu\text{g}$  DNA. Průměrná hodnota dpm/ $\mu\text{g}$  DNA spolu se směrodatnou odchylkou se používají k vyjádření distribuce inkorporace.

Údaje se vyhodnocují vhodnými statistickými metodami.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje, je-li to možné, informace o:

- použitých buňkách, jejich hustotě a číslu pasáže v době ovlivnění kultury, počtu buněčných kultur,
- metodách použitých k udržování kultury, médiu, teplotě, koncentraci  $\text{CO}_2$ ,
- testované látce, rozpouštědle, koncentracích a zdůvodnění jejich výběru v experimentu,

- metabolickém aktivačním systému,
- pokusném schématu,
- pozitivních a negativních kontrolách,
- použitých autoradiografických metodách,
- způsobech blokování vstupu buněk do S-fáze,
- postupech použitých k extrakci DNA, a k vyhodnocení celkového obsahu DNA při metodě LSC,
- vztahu dávka/účinek, je-li to možné,
- statistickém vyhodnocení,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## B.19 SCE - VÝMĚNA SESTERSKÝCH CHROMATID IN VITRO

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

SCE je krátkodobý test pro detekci recipročních výměn DNA mezi dvěma sesterskými chromatidami chromozómu. SCE representují výměny identických sekvencí DNA mezi replikačními produkty v identických (homologních) lokusech. SCE pravděpodobně vyžaduje zlom a opětovné spojení, ale je zatím málo znalostí o molekulárním základě tohoto procesu. Detekce SCE vyžaduje diferenční značení sesterských chromatid. Toho se dosahuje inkorporací bromodeoxyuridinu (BrdU) do chromozomální DNA na dobu dvou buněčných cyklů.

Savčí buňky *in vitro* jsou exponovány testované látce v přítomnosti i bez přítomnosti exogenního metabolického aktivačního systému, je-li to potřebné. Kultivují se po dobu dvou replikačních cyklů v médiu obsahujícím BrdU. Ke konci kultivace se buňky ovlivní inhibitorem dělícího vřeténka (např. kolchicin) k akumulaci buněk v c-metáfazi mitózy. Po ukončení kultivace jsou buňky zpracovány a připraveny preparáty pro analýzu chromozómů.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Používají se primokultury, (lidské lymfocyty) nebo stabilizované buněčné linie (ovariální buňky čínského křečka). Buněčné linie musí být kontrolovány z hlediska kontaminace *Mycoplasmaty*,

Používají se vhodná kultivační média a kultivační podmínky (teplota, kultivační nádoba, koncentrace CO<sub>2</sub> a vlhkost),

Testovaná látka se rozpouští, nebo suspenduje v kultivačním médiu, nebo ve vhodném rozpouštědle. Výsledná koncentrace rozpouštědla nesmí významně ovlivnit životnost buněk, rychlosť růstu nebo frekvenci SCE,

Buňky se exponují testované látce v přítomnosti i bez přítomnosti vhodného exogenního savčího metabolického aktivačního systému. Připouští se použití buněčných typů s vnitřní (vlastní) metabolickou aktivitou, jestliže úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro testovanou skupinu chemických láték.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Počet kultur

Pro každý experimentální bod se použijí nejméně dvě kultury.

###### 1.2.2.2 Negativní a pozitivní kontroly

V každém experimentu musí být zařazeny pozitivní kontroly s látkami s přímým mutagenním účinkem a látky vyžadující metabolickou aktivaci. Dále musí být použita negativní kontrola s použitým rozpouštědlem.

Jako pozitivní kontrolu lze použít:

- přímo působící mutageny: etylmetansulfonát
- nepřímo působící mutageny: cyklofosfamid

Je-li třeba, je možné zařadit další pozitivní kontrolu ze stejné chemické skupiny jako je testovaná látka.

#### 1.2.2.3 Koncentrace

Testují se nejméně tři dávky. Nejvyšší koncentrace testované látky musí mít signifikantní toxický účinek, ale zároveň musí umožnit adekvátní replikaci buněk. Ve vodě relativně nerozpustné látky je třeba testovat až na hranici jejich rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší použitá koncentrace ve vodě rozpustné netoxické látky se určuje individuálně.

#### 1.2.3 Popis postupu

##### 1.2.3.1 Příprava kultur

Stabilizovaná buněčná linie se připravuje se zásobní kultury (trypsinací, nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), inkoluje se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubuje při 37 °C. Pro monovrstevné kultury se stanoví takový počet buněk v kultivační nádobě, aby na konci kultivace nevytvářely více než z 50 % konfluentní vrstvu. Lze také použít suspensních kultur. Lidské lymfocytární kultury se připraví z heparinizované krve běžnými postupy a inkubují při 37 °C.

##### 1.2.3.2 Uxpozice kultur

Buňky jsou exponovány testované látce v exponenciální fázi růstu po vhodnou dobu. Ve většině případů stačí jedna až dvě hodiny, ale expozice může být prodloužena až na dva buněčné cykly, je-li to třeba. Buňky, které nemají dostatečnou vlastní metabolickou aktivitu, musí být exponovány testovanou látkou v přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expozice je testovaná látka z média odstraněna, buňky vymyty a dále kultivovány v růstovém médiu s BrdU dva replikační cykly. Alternativně mohou být buňky exponovány současně s testovanou látkou a BrdU po dobu dvou buněčných cyklů.

Lidské lymfocytární kultury jsou exponovány testovanou látkou dokud jsou v semisynchronizovaných podmírkách.

Buňky jsou analyzovány v druhém mitotickém dělení po expozici testované látce, která proběhla v nejcitlivějším stádiu buněčného cyklu. Všechny kultury s BrdU je třeba udržovat v temnu, nebo ve světle zastíněné žárovky, aby se zabránilo fotolýze DNA ve které je inkorporovaný BrdU.

##### 1.2.3.3 Zpracování buněk

Jednu až čtyři hodiny před ukončením kultivace se do kultur přidá inhibitor dělicího vřeténka (např. kolchicín). Každá kultura se zpracovává samostatně.

#### 1.2.3.4 *Příprava preparátů a barvení*

Preparáty se připraví standardní cytogenetickou technikou. Barvení preparátů ke znázornění SCE může být provedeno několika technikami (např. fluorescenční plus Giemsa).

#### 1.2.3.5 *Analýza*

Počet analyzovaných buněk je závislý na spontánní frekvenci SCE v kontrole. Obvykle se hodnotí nejméně 25 dobře rozprostřených metafází na každou kulturu. Preparáty musí být zakódovány před analýzou. V lidských lymfocytech se analyzuje pouze metafáze s 46 centromerami. U stabilizovaných linií pouze metafáze, které se liší o  $\pm 2$  centromery od modálního počtu centromer. Je třeba stanovit, zda se budou analyzovat SCE v oblasti centromery. Výsledky musí být ověřeny v nezávislých experimentech.

### 2. ÚDAJE

Údaje se zpracovávají tabulkovou formou. Zaznamenává se počet SCE v každé metafázi a počet SCE/chromozóm zvlášť pro každou metafázi v exponovaných i kontrolních skupinách.

Údaje se hodnotí vhodnými statistickými metodami.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu obsahuje, je-li to možné, informace o:

- použitych buňkách, metodách použitych k udržování kultury,
- kultivačních podmínkách: složení média, teplotě, koncentraci  $\text{CO}_2$ , koncentraci testované látky, rozpouštědle, kultivačních nádobách, délce expozice, inhibitoru mitozy a jeho koncentraci i jeho délce působení, metabolickém aktivačním systému, pozitivních a negativních kontrolách,
- počtu kultur pro každý experimentální bod,
- způsobu přípravy mikroskopických preparátů
- počtu analyzovaných metafází (odděleně pro každou kulturu)
- průměrném počtu SCE/buňku a SCE/chromozóm (odděleně pro každou kulturu)
- kritériích hodnocení SCE
- zdůvodnění výběru koncentrací
- vztahu dávka/účinek, je-li to možné,
- statistickém vyhodnocení,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.