

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 látek 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 vysoce toxických, toxických, zdraví škodlivých, žíravých, dráždivých, senzibilizujících, karcinogenních, mutagenních a toxických 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. Oddíl 4 – vliv na zdraví (OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 4 – Health Effects).

## Metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

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

#### 1. 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 hlodavcích.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími 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 vehikulí musí být známy nebo určeny před testem nebo během něho jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by objem neměl normálně překročit  $10 \text{ ml.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti; výjimkou jsou vodné roztoky, jichž je možno podávat až  $20 \text{ ml.kg}^{-1}$ . 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 pohlaví

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 popsanych 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. Doba 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 odebere 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 přístupu 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 opatřeními 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 přežijí až do konce pokusu, se pitvají. Všechny patologické nálezy se zaznamenávají. 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 z

vířat 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 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 lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a 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, potrava atd.,
- experimentální podmínky,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- pohlaví zvířat,
- tabelárně údaje o odpovědích 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 kritéria 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 víc 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 odvodí 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 žádné další testování. Když na zvolené úrovni dávky není pozorována zřejmá toxicita, látka se znovu otestuje na nejbližší vyšší úrovni dávky. Pokud zvířata uhynou nebo když závažná toxická reakce vyžaduje humánní utracení, látka se znovu 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 přetrvávajícími 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 variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  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 vehikulí musí být známy nebo určeny před testem nebo během něho jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by objem neměl normálně překročit  $10 \text{ ml.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti; výjimkou jsou vodné roztoky, jichž je možno podávat až  $20 \text{ ml.kg}^{-1}$ . 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

Vyšetřují 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 dní; pokud přetrvávají projevy mírné otravy sedmý den, zvíře se musí pozorovat ještě po dalších sedm dní. Posuzují se následující výchozí hladiny dávek: 5, 50, 500 a  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Jestliže zvolená výchozí dávka nevyvolá těžkou otravu a přitom nejbližší vyšší vyvolá uhynutí, potom je nutné podat podle potřeby jednu nebo více vymezených úrovní dávek. Tento způsob by měl poskytnout informace o úrovni(ích) 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  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Jestliže se po výchozí dávce nepozorují příznaky otravy, vyšetřuje se další vyšší úroveň dávky. Jestliže nedojde k uhynutí při  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ , je orientační studie skončena a hlavní studii je třeba provést na této úrovni dávky. Jestliže jsou při použití výchozí dávky (např.  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) zjištěny těžké účinky, vyžadující humánní utracení, je podána dalšímu zvířeti nejbližší nižší dávka (např.  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Jestliže toto zvíře přežívá, mohou být použity pro další zvířata vhodné dávky mezi určenými fixními dávkami. Za normálních podmínek 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 toxických 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 mg.kg<sup>-1</sup> 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 znovu testovat na další vyšší úrovni dávek. Zvířata by však měla být dále pozorována tak, aby pozorovací období bylo kompletní. Jestliže těžká toxická odpověď vyžaduje humánní utracení zvířat nebo když se projeví mortalita vlivem látky, měla by být látka znovu 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 rigorózně. Měla by být určena podle obrazu otravy, rychlosti vývoje otravy a trvání fáze zotavení. Doba 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 toxických 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 výjimečně třetí hladiny dávky.

V případě, že látka vyvolává mortalitu při dávce 5 mg.kg<sup>-1</sup> (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 humanitních důvodů; popis toxických účinků; pro hlavní studii, zda byl pozorován zřejmý toxický účinek, který lze připsat testované látce; časový průběh všech toxických účinků; výsledky pitvy. V případě, že zvířata přežívají déle než den, je třeba vypočítat a zaznamenat změny hmotnosti.

Zvířata, která jsou humanitně 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,
- úroveň 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 toxických příznaků a zda byly reversibilní,
- pokud zvířata uhynula nebo byla utracena, doba úhynu po podání látky, důvody a kritéria použita pro indikaci humanitního 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 nabo 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	Méně než 100% přežití  100% přežití s nebo bez zřejmé toxicity	Viz výsledky u 500 mg.kg <sup>-1</sup>  Látky, které <i>nemají významnou akutní toxicitu</i>

## **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 popsany pro tuto testovací metodu umožňuje 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>. Umožňuje 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 popsany 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 toxická charakteristika; pokud není známa, musí být stanovena ještě před testem.

Zvířata jsou před aplikováním látky po určitou dobu bez potravy (např. potkani 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 pohlaví

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 dráždivými účinky značnou bolest a stres.

Časový interval mezi aplikačními skupinami je závislý na rychlosti nástupu, na trvání a závažnosti toxických 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 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti se provádí na třech zvířatech každého pohlaví. Pokud dojde k uhynutí souvisejícím s podáním látky, lze další testování provést při dávkách 200 mg.kg<sup>-1</sup> (nebo 500 mg.kg<sup>-1</sup>) 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 toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky zotavovacího období. Je důležité zaznamenávat dobu, kdy se objeví a mizí příznaky toxicity, zvláště jde-li o zpožděné toxické 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 zkušební 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 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 též 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 přetrvávajícího silného stresu, je třeba humánně utratit: tato zvířata jsou hodnocena stejně jako jako zvířata uhynulá.

At' 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 *P i t v a*

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 shrnuty 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 počáteční 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 způsobí 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 uhne pouze jedno zvíře druhého pohlaví, obvykle se již dále netestuje. Pokud však přitom nejsou u ostatních 5 zvířat žádné toxické příznaky, je třeba pitvou ověřit možnost, že úmrtí nesouviselo s podanou 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 uhne 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 toxické 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 stejné 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

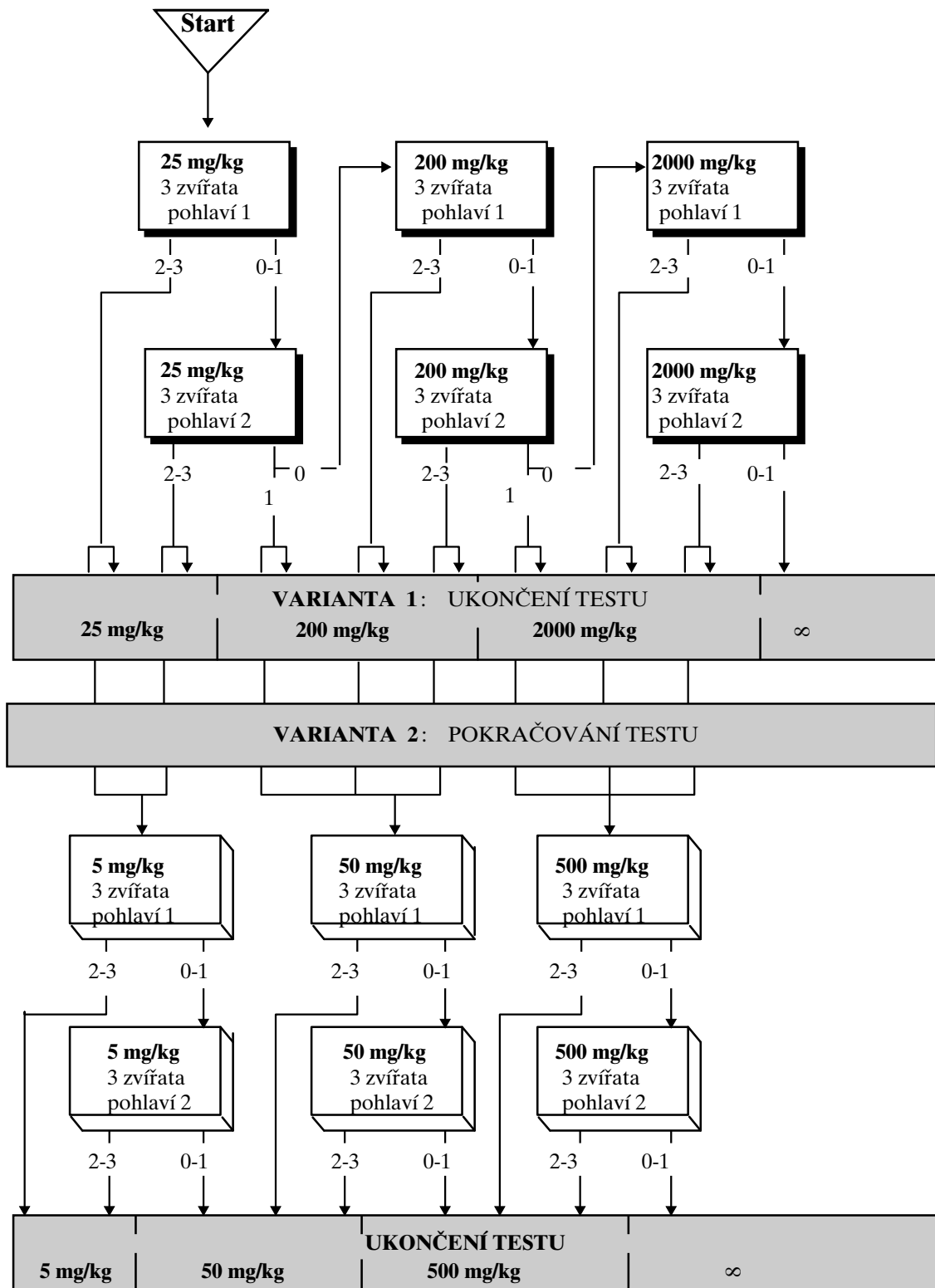
### Interpretace výsledků založených na testovací variantě 1

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

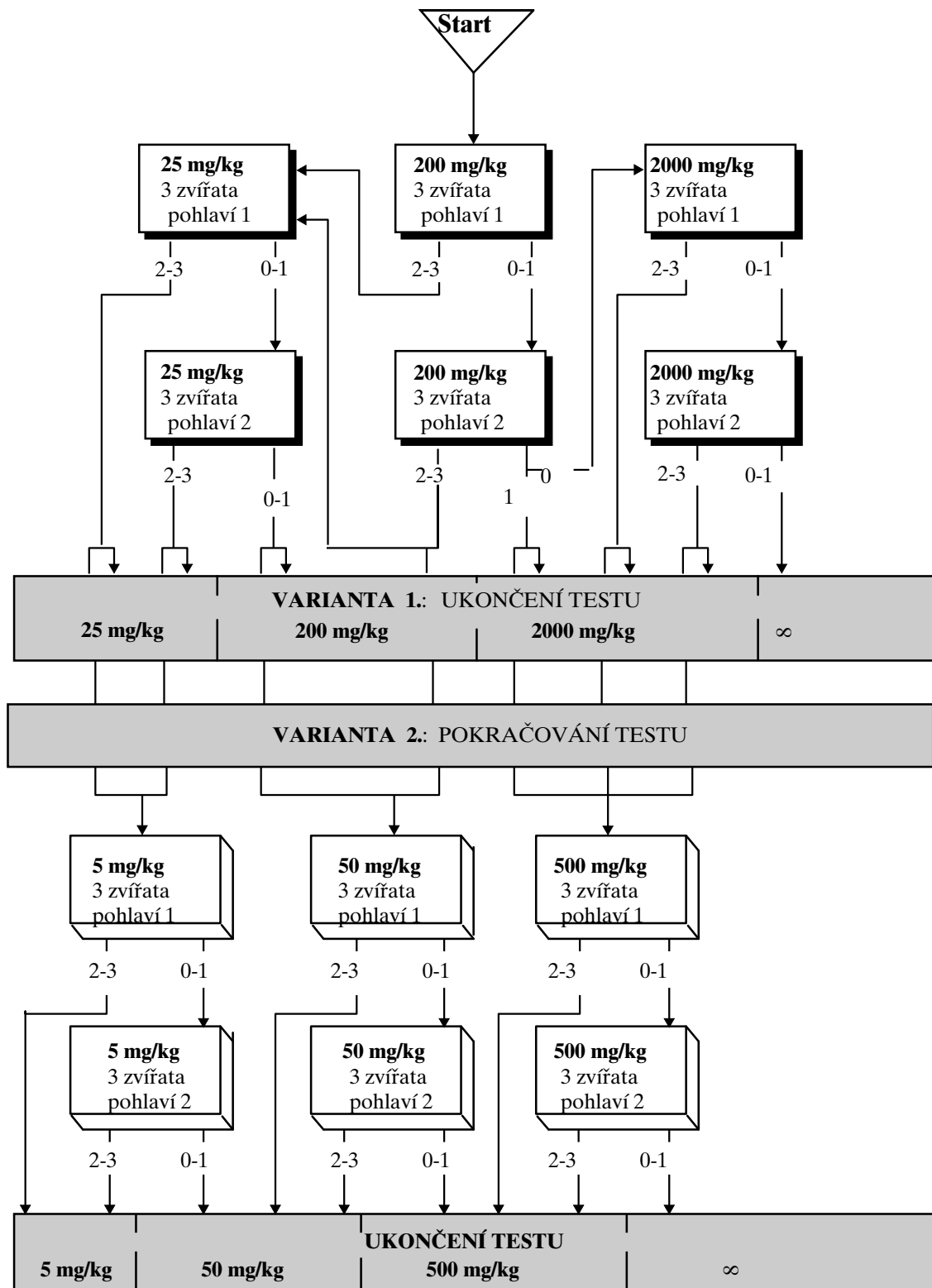
Pod rámečky je počet uhynulých nebo utracených zvířat (0, 1, 2, 3).

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  $LD_{50}$  je větší než hodnota v nejbližším rámečku vlevo.)

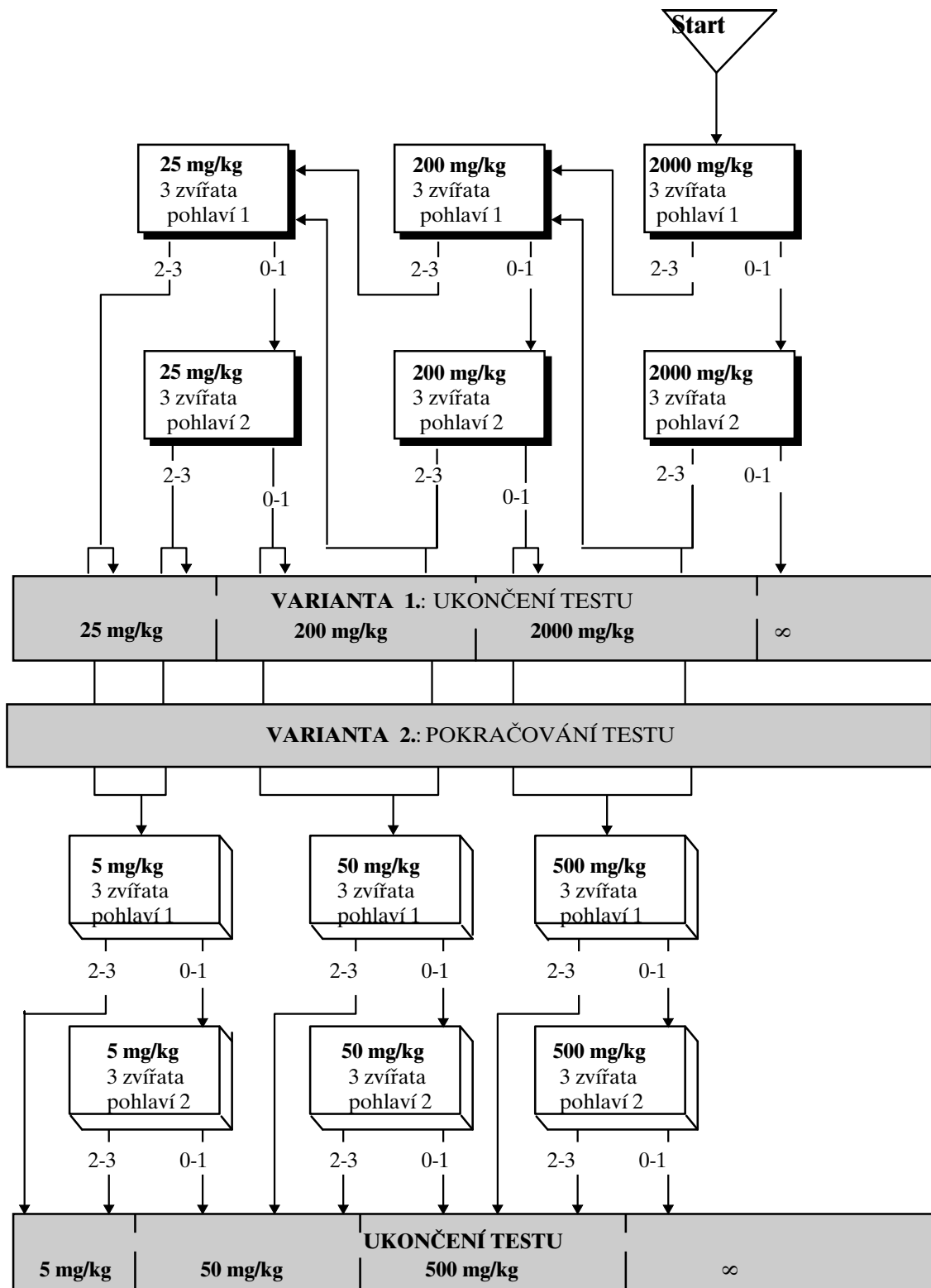
**( a ) Testovací postup s výchozí dávkou 25 mg/kg tělesné hmotnosti**



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

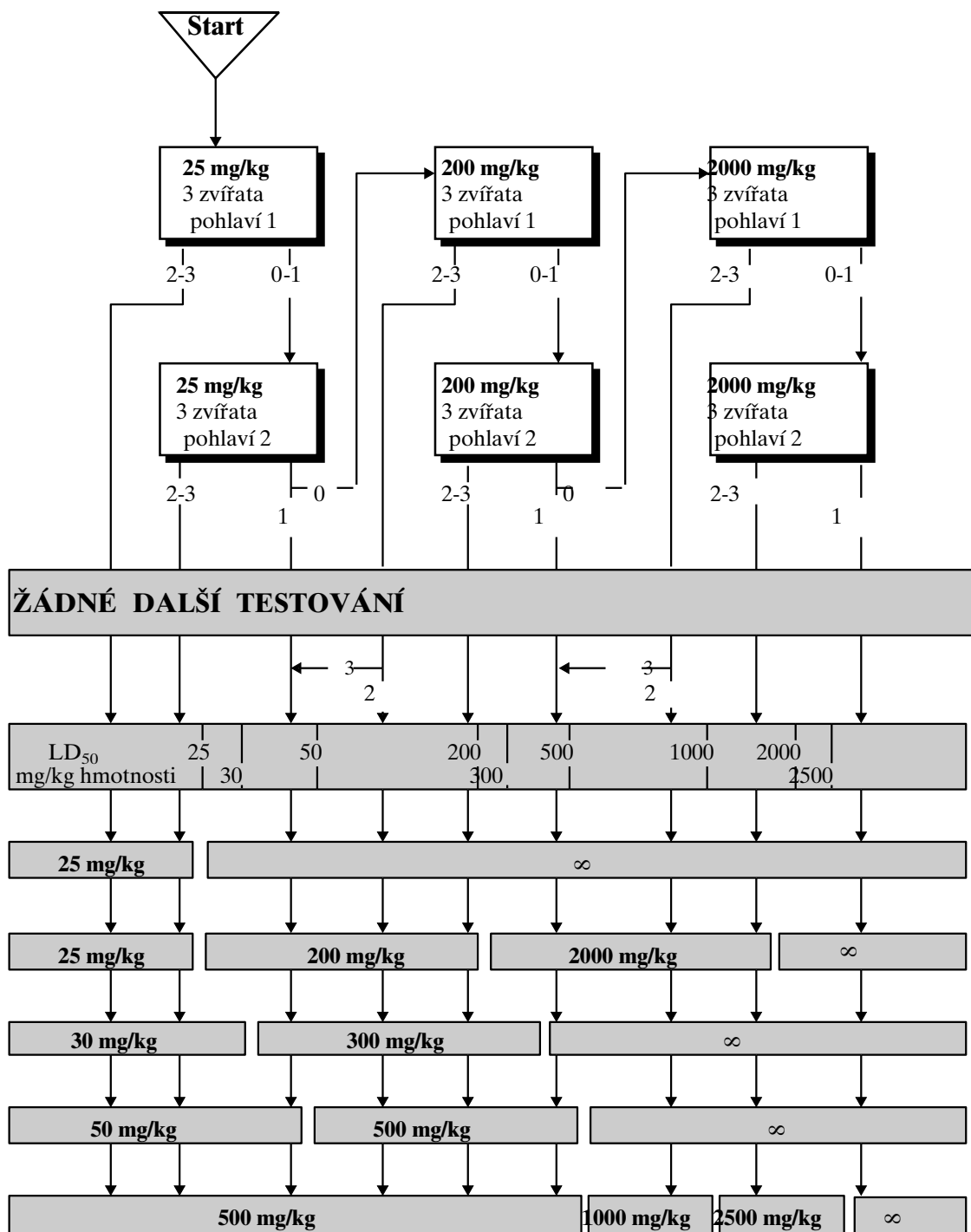


**( c ) Testovací postup s výchozí dávkou 2000 mg/kg tělesné hmotnosti**

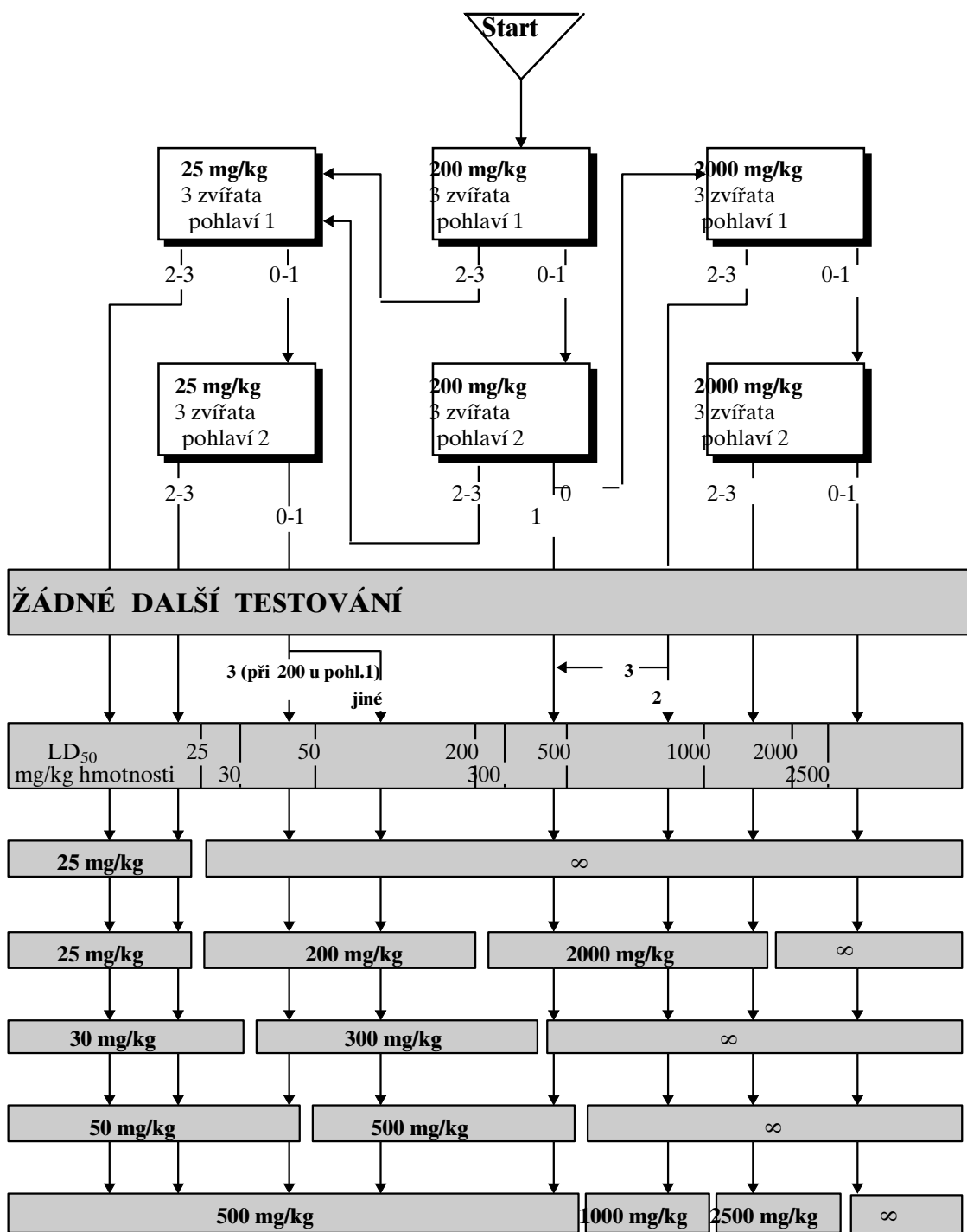


**Interpretace výsledků založených na testovací variantě 1**

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

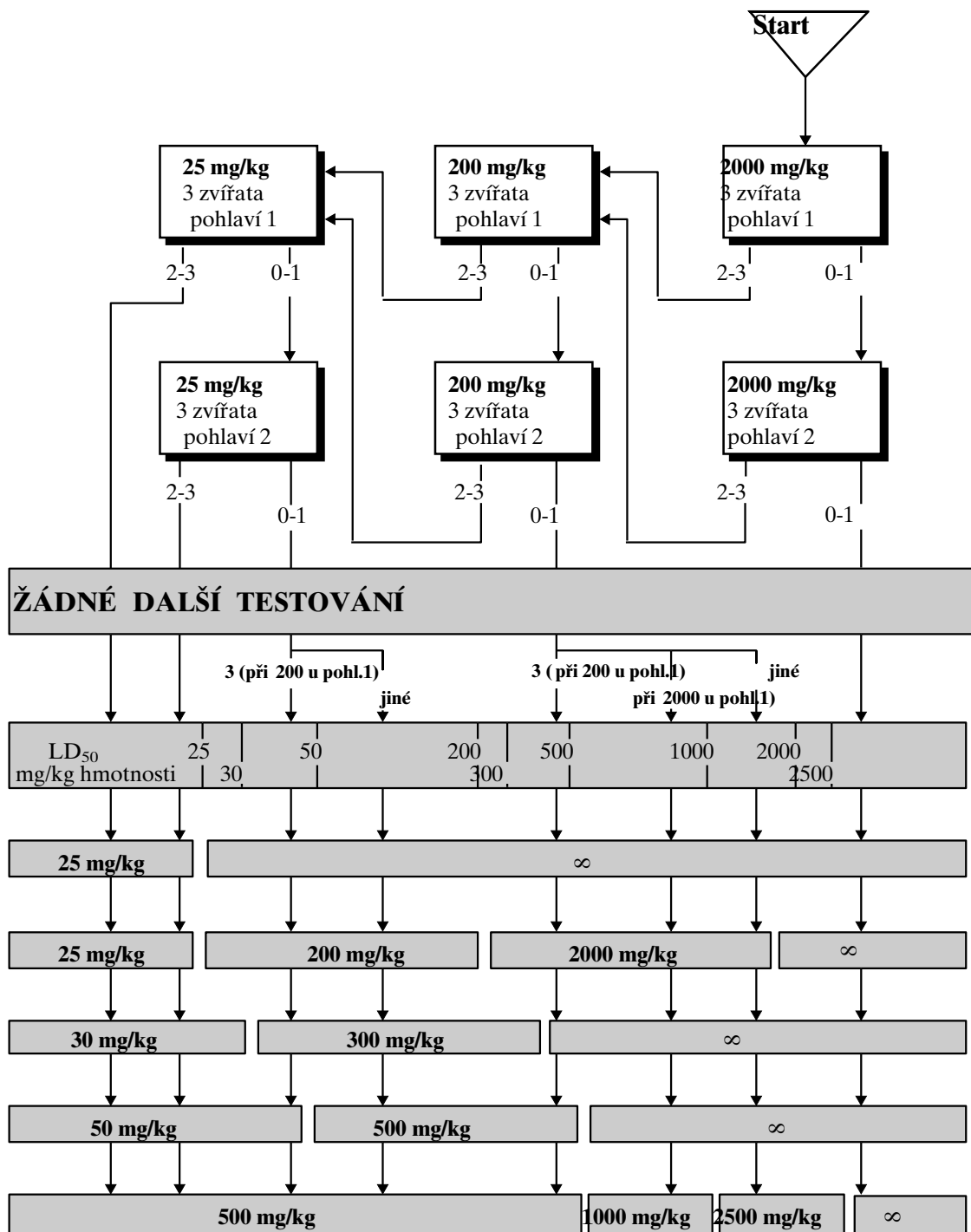


**b) Výchozí dávka 200 mg/kg tělesné hmotnosti**





**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 velikostí 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 přetrvávajícími 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 přiřadí 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 toxický 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 pohlaví

Pro každou dávkovou hladinu je třeba použít nejméně 10 hlodavců (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 toxické 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  $LC_{50}$  s přijatelnou spolehlivostí.

#### 1.3.2.4 *Limitní test*

Nedojde-li po 4 hodinové expozici 5 samců a 5 samic plynu v koncentraci  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  nebo parám či aerosolu tekuté nebo pevné látky v koncentraci  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  (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 látky 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. Doba 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 patrna 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  $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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 ( $\leq 5 \text{ mm}$

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 zóně 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 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 částic a aerosolů, měří se distribuce velikostí částic 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 pívního 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 zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací 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.  $LC_{50}$  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) rychlost 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 toxických 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  $LC_{50}$  pro každé pohlaví stanovená po skončení doby pozorování (s uvedením metody výpočtu);

- 95%-ní interval spolehlivosti pro  $LC_{50}$  (pokud je možno jej stanovit);

- křivka závislosti mortality na dávce (koncentraci) a její směrnice (pokud to dovoluje metoda stanovení); - pitevnické nálezy;

- všechny histopatologické nálezy;

- diskuse výsledků (se zvláštním zřetelem k vlivu případného utracení zvířat z humánních důvodů během testu na vypočtenou hodnotu  $LC_{50}$ );

- 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 kůží. Výběr vehikula by se měl řídit tím, v jaké formě se může daná látka dostat do styku s lidskou kůží, a ze všech relevantních způsobů vybrat ten, který nejvíce usnadňuje průnik kůží. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěné.

###### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Používá 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 hlodavci, 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. Doba pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Rozhodující je doba, kdy se příznak otravy projeví a vymizí 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 stejnoměrně na co největší část této plochy.

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 překryt, 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 odpovídající 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 pohlaví*

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 humánním 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 lézí, 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 14denní pozorování (s uvedením metody výpočtu),
- 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 utrácením 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 výrazné 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 mg.kg<sup>-1</sup> 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 popíše 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. abrazy). Je možno použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka 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 nenaznačují 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 případů 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 mul, 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 expozice 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 nevyklučuje. 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 naznačují, 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 navrhnout 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 tabulce 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 odpovědí, maskovaných zbarvením 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 pokusné 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 toxické 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 toxických 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 součtů 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 zřejmé 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 králíku.

### 1.2.2.2 Počet zvířat

Jestliže se očekávají výrazné účinky, je třeba zvolit test na jediném zvířeti. Jestliže výsledky tohoto testu na jednom králíkovi 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 tři 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 trnitých 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 rozemlít na jemný prášek. Objem homogenní látky se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním 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 anestetizovat 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 králíků, kterým se brzy po instilaci látky vymyjí oči. V těchto případech se doporučuje použít 3 králíky. 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. Doba pozorování je třeba prodloužit, pokud přetrvává 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 testující laboratoře a ty, kdo provádějí hodnocení, je možno použít ilustrovanou referenční tabulku podráždění oka.)

Vyšetřování reakcí je možno usnadnit použitím binokulární lupy, ruční šterbinové 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. šterbinová lampa, oční mikroskop, fluorescein atd.,
- popis všech zjištěných mimoočních místních účinků,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.



## 4. DODATEK

## 4.1 Stupnice změn na oku

Hodnota

**A. Spojivka - otok**

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. Spojivka - slzení**

Slzení není přítomno 0

Slabé slzení (nutno odlišit od běžné sekrece ve vnitřním koutku 1

Slzení se zvlhčením víček a srsti v blízkosti oka 2

Slzení se zvlhčením víček a srsti v širokém okolí oka 3

**C. Spojivka - enantém**

Cévní kresba normální 0

Nastříknutí cév zřetelně výraznější oproti normě 1

Splývající cévní kresba, rozlišení jednotlivých cév nesnadné, difuznější jasně červená barva 2

Difuzní tmavě červená barva 3

**D. Duhovka - anomálie**

Anomálie nejsou přítomny 0

Nepravidelná struktura duhovky, překrvení, 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 hemorhagie v duhovce (jedna nebo více těchto charakteristik) 2

**E. Rohovka - stupeň neprůhlednosti**

	Hodnota
Neprůhlednost není přítomná	0
Neprůhledná oblast je difuzního diseminovaného charakteru, detaily duhovky zůstávají jasně viditelné	1
Neprůhledná oblast je průsvitná, snadno se identifikuje, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou vůbec viditelné; obrys zornice stěží viditelný	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

#### **F. Rohovka - plocha neprůhlednosti**

Neprůhlednost je pozorovatelná, ale její plocha je $\leq 1/4$ plochy rohovky	1
$1/4 <$ plocha neprůhlednosti $\leq 1/2$ plochy rohovky	2
$1/2 <$ 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 kůží.

Testy na morčatech lze rozdělit na testy s adjuvans, ve kterých je alergický stav potencionován 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 zprostředkovaná 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 látky 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 dávkou. 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 (GPM 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 mírné 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 smísením s FCA ve vodné fázi. Látky rozpustné v lipidech nebo látky nerozpustné se rozptýlí 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 nejbližší hlavě, zatímco injekce 3 směrem ke kaudální části testovací plochy.

#### Den 0 - Kontrolní skupina

Následující 3 dvojice subkutánních 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 směsí 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 oholení 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 znovu zbaví srsti. Samotné vehikulum 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 oholí 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 pohlaví

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 mírné ale ne velmi silné 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 nedráždicí 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 ostříhán). 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 překryvacím plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

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

s použitím vhodného přidržovače, aby se zajistila 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 znovu 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 bok 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. 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.

## 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 ztlustění 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, použité 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 výsledku*

##### *Závěry*

### 4. LITERATURA

Tato metoda je analogická s metodou OECD TG 406.

## **Dodatek**

### *5.1 Stupnice Magnussona/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 positivity 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 OPAKOVANÁ 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 pokusu, 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 jedlém rostlinném oleji (např. kukuřičném) a pak roztoku v jiných nosičích. Pro nevodná vehikula musí být známa jejich toxická 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 kmenů. 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 vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických 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 toxické 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 toxické 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 přetrvávání 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 dobu 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, zjevení srsti, velikost zornic) a případně další. Zaznamenávají se změny chůze, polohy, dále reakce na manipulaci, přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (vytrvalé čisticí pohyby nebo kroužení) nebo bizarních vzorců chování (např. sebepoškozování, pohyb pozadu).

Ve čtvrtém týdnu aplikace se otestují reakce na různé sensorické 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 analýz krve za účelem posouzení závažných toxických účinků na tkáň, 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, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, 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 řádně očistí od ulpěných tkání a co nejdříve po sekci se zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

<sup>1)</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 jemné 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 přídatné 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 dřevě (nebo čerstvý nátěr z nasáté kostní dřevě). 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 humanitních důvodů, dobu úmrtí jednotlivých zvířat, popis toxických 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;
- přepočítání 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 toxických 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, tenze 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 toxických 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 přiřadí 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 toxický 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 pohlaví*

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 sate litní skupinu 10ti zvířat (5 zvířat každého pohlaví) po dobu 28 dnů a během následujících 14 dnů sledovat vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických

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

#### 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 toxické 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 toxický účinek na hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 úrovně koncentrací, mají být voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické 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 látky 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 toxické účinky. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a čas, ve kterém se objeví a opět odezní toxické 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 přetrvávání toxických účinků. Teplota během experimentu má být  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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) zabrání 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 získání potřebných koncentrací.

Rychlost průtoku vzduchu je třeba nastavit tak, aby podmínky v celém expozičním boxu byly stejné. Systém musí zaručovat, že stabilních podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji.

Měření nebo monitorování podmínek expozice:

a) Měření průtoku vzduchu (kontinuálně).

b) Skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zóně. 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 částic a aerosolů, měří se distribuce velikosti částic 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 třeba 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 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), 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, draslíku, 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. Aspoň játra, ledviny, nadledviny, plíce 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 velikostí) 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 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 :

- 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) rychlost průtoku vzduchu inhalačním zařízením; b) teplota a vlhkost vzduchu; c) nominální koncentrace (celkové množství testované látky přiváděné 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 toxických odpovědích podle pohlaví a podle koncentrací,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických 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,
- pitevnické 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 přežijí 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. abrazy). 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 případně upraveny do práškové formy, je třeba danou látku dostatečně navlhčit vodou, případně vhodným vehikulem, aby byl zaručen dobrý kontakt s kůží. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěné. 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, králíky 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 zpožděný 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 nepůsobit žádné uhynutí nebo jen v malém počtu. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady 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 vymezené 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  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  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 odezní 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 přetrvávání. 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 autonomie 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), aspartátaminotransferasa 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, draslíku, glukózy na lačno, lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

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

#### 1.2.3.1 *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),
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- údaje o toxických odpovědích 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 linií, tak primárních kultur. Po expozici testované látky v přítomnosti i nepřítomnosti savčího exogenního metabolického aktivačního systému je do buněčné kultury aplikován mitotický jed (např. kolchidin) ke kumulaci dělicích se buněk (C metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a pak připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny 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 čínskému 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 toxická, 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 lymfocyty:* 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 lymfocytů se exponují v semisynchronní fázi růstu.

##### (b) Expozice se směsí pro metabolickou aktivaci

Testovaná látka by měla být přítomna spolu s aktivačním systémem co nejdéle, aniž by přitom vyvolávala toxický 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 inhibitory dělicího 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 odpovídal přibližně jednomu buněčnému cyklu a druhý byl později. Tím se mají pokrýt všechny fáze buněčného cyklu a počítat s jeho případným 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 metafází 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 dávkovou 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 metafází (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 získání 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 metafází (samostatné údaje pro jednotlivé kultury),
- mitotický index nebo jiné známky cytotoxicity
- typ a počet aberací pro exponovanou a kontrolní kulturu, modální počet chromozómů 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 chromozomových 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 usmrtí 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 čínští 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, jejíž efekt po jednorázové aplikaci musí být zhodnocen, je 2 000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti.

Jestliže se použije opakované dávkování, limitní dávka je 1000 mg.kg<sup>-1</sup> 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 opakované aplikace, jsou možné. Zvířata by se pak měla usmrtit 6 a 24 hodin po poslední aplikaci.

##### *Zpracování kostní dřevě*

Před usmrcením zvířat se jim intraperitoneálně vstříkne vhodná dávka mitotického jedu, aby se získal dostatečně velký počet buněk, které jsou v C-metafázi. Kostní dřevě 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.

##### *Analýza*

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.

## 2. ÚDAJE

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 erythrocytech exponovaných zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Mikrojádra se tvoří z fragmentů chromozomů nebo celých chromozomů opožděných v mitóze. Při vývoji erythrocytů z erythroblastů je jádro vytlačeno, zatímco mikronukleus může zůstat v cytoplasmě. V tomto testu se proto vyhodnocují mladé polychromní erythrocyty z kostní dřene laboratorních savců, kterým byla vhodnou cestou aplikována testovaná látka. Kostní dřeň se vypláchne ze stehenních kostí zvířat, zhotoví se nátěry a obarví se. Mikroskopicky se zjišťuje počet mikrojader v polychromních erythrocytech a mimoto se stanoví poměr polychromních erythrocytů 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 opakované aplikace. Jsou však na místě jen tam, kde testovaná látka nemá žádné cytotoxické účinky na buňky kostní dřene. 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 rozpouštědlem) 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, jejíž 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 mikrojadér, který se však může lišit u různých látek. Proto je kostní dřevina odebrána 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 dřeviny*

Kostní dřevina 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 sklíčko, připraví se nátěry a po vysušení na vzduchu se obarví.

##### *Analýza*

Podložní sklíčka 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 mikronukleí, procento buněk s mikronukleí a poměr normochromních a polychromních erytrocytů se uvedou samostatně pro všechna exponovaná zvířata i pro 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 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 bazí 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 vylíje 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 aktivčního 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

Používají se tři kmeny - 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 kmeny 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 revertant, 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 promísí 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 počítají 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 série, tak pro série s testovanou látkou. Je třeba uvést jednotlivé i průměrné hodnoty revertant 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  $his^- \rightarrow his^+$  indukovaná chemickými látkami typu záměny bazí nebo posunových mutací v genomu organismu.

Bakterie se vystaví působení testované látky s přídatkem a bez přídatku metabolického aktivačního systému a nanesou se na minimální médium. Po přiměřené inkubační době se spočítají kolonie revertovaných buněk a porovnájí s počtem spontánních revertantů v neexponované kontrolní kultuře a v kontrolní kultuře s přídatkem 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 časně 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 přídatkem, tak i bez přídatku 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. Doplnkově je možno používat další kmeny jako TA 1538 a TA102. 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 revertantů 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 rozpouštědlům.

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 revertant, 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 bakterií k vrchnímu agaru přidá 0,5 ml aktivační směsi s vhodným množstvím postmitochondriální frakce. Obsah každé zkumavky se promísí 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 misku. 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 tři misky na jednu koncentraci.

## 2. ÚDAJE

Uvedou se počty revertantních kolonií na misku jak pro kontrolní série, tak pro série 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 míravnikumutací 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 bází, které indukují mutace ve specifickém místě, nebo okrové supresorové mutace. XV 185-14C 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 látek a kontrol mají být připraveny těsně před testováním za použití vhodného vehikula. U organických látek ve vodě nerozpustných se nemá užít roztok vyšší než 2 objemová % v organických rozpouštědlech jako je etanol, aceton nebo dimetylsulfoxid (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 látek 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 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. U toxických 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.

#### 1.2.2.5 *Kultivační podmínky*

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

#### 1.2.2.6 *Frekvence spontánních mutací*

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

#### 1.2.2.7 *Počet replikací*

Je nutno použít nejméně tři 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 x 10<sup>7</sup> 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 indukci 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 kolonií, 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 REKOMBINACE - 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 recesivních homozygotních kolonií nebo sektorů vzniklých u heterozygotních kmenů, genová konverse je testována na základě tvorby prototrofních revertant vzniklých u auxotrofního heteroalelického kmene, který nese dvě různé defektní alely téhož genu. Nejčastěji užívané kmeny pro detekci mitotické genové konverse 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 produkující 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 mutace 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 nerozpustných se nemá užit roztok vyšší než 2 objemová % v organických rozpouštědlech jako je etanol, aceton nebo dimetylsulfoxid (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 aktivačního systému. Nejčastěji užívaným systémem je postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců po aplikaci látek 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

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 toxických 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 replikací*

Je nutno použít nejméně tři misek na jednu koncentraci u testu prototrofních buněk tvořených mitotickou genovou konversí a pro určení životnosti buněk. V případě testování recesivní 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 přežívající buňky a buňky s indukci 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 rekombinací.

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 medií, 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 rekombinací, 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 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasy. Systémy TK a HPRT detekují mutace párování basí; frameshift mutace a malé delece. Systém Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> detekuje pouze mutace párování basí.

Buňky s deficiencí thymidin kinasy (TK), vyvolanou forward mutací TK<sup>+</sup> - TK<sup>-</sup>, 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 syntésou *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 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasy jsou selektivně resistantní k ouabainu.

Cytotoxicita je stanovena měřením účinku testovaného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (cloning efficiency) nebo rychlostí 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 kontrolována stabilita

karyotypu a měly by být kontrolovány 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 rychlost 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 látek.

### 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 látek, které mohou být použity jako pozitivní kontroly:

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

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 látky 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 kolonií 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 linie, 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 reparační syntézu DNA po excizi a odstranění části DNA obsahující oblast poškození indukovaného chemickými, nebo fyzikálními faktory. Test je založen na inkorporaci značeného tymidínu ( $^3\text{H-TdR}$ ) 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 bod je potřeba nejméně dvou buněčných kultur pro autoradiografii 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-dimethylbenzanthracen (7,12-DMBA), nebo 2-acetylaminofluoren (2-AAF). Jako pozitivní kontrolu pro stabilizované buněčné linie jak pro autoradiografii, 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-dimethylnitrosamin.

### 1.2.2.3 *Koncentrace testované látky*

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

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.

### 1.2.2.4 *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), inokuluje se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubuje při 37 °C.

Krátkodobé kultury potkanních hepatocytů se připravují tak, že se umožní čerstvě izolovaným 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 izolované hepatocyty potkana jsou exponovány testované látce v médiu obsahujícím <sup>3</sup>H-TdR po vhodnou dobu. Po ukončené expozici 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 vrcholu 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 způsobí 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/ $\mu\text{pg}$  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 reprezentují 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 látky 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 dělicího vřeténka (např. kolchicín) k akumulaci buněk v c-metafázi 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 čínské křečka). Buněčné linie musí být kontrolovány z hlediska kontaminace *Mycoplasmaty*,

Používají se vhodná kultivační média a kultivační podmínky (teplota, kultivační nádoby, 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, rychlost růstu nebo frekvenci SCE,

Buňky se exponují testované látky 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 látek.

##### 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: cyklofosamid

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), inokuluje 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 podmínkách.

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 analyzují 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 zvláště 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:

- použitých buňkách, metodách použitých k udržování kultury,
- kultivačních podmínkách: složení média, teplotě, koncentraci CO<sub>2</sub>, koncentraci testované látky, rozpouštědla, 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.



## **B.20 RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U DROSOPHILA MELANOGASTER**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Test na recesivní letální mutace vázané na pohlaví (SLRL) na *Drosophila melanogaster* umožňuje detekci mutací, jak genových, tak i malých delecí, v zárodečných buňkách hmyzu. Je to test na forward mutace vhodný pro skríníng mutací v přibližně 800 lokusech chromozómu X. Tyto reprezentují asi 80 % všech lokusů X-chromozómu. X-chromozóm reprezentuje přibližně 1/5 celého haploidního genómu.

Mutace v X-chromozómu se fenotypicky projeví u samců nesoucích mutovaný gen. Když je mutace letální v hemizygotním stavu lze na její přítomnost usuzovat z absence jednoho ze dvou typů samčích potomků, kteří se normálně rodí heterozygotní samici. SRLS test je výhodný vzhledem k zvláštnímu vzhledu a uspořádání chromozómů.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

###### 1.2.1.1 Zdroje

Používají se samci dobře definované divoké linie a samice linie Muller-5. Mohou být použity i jiné vhodné dobře popsane linie samic s vícenásobnou inverzí X-chromozómu.

###### 1.2.1.2 Testované látky

Testované látky se rozpouštějí ve vodě. Látky ve vodě nerozpustné se rozpouštějí, nebo suspendují ve vhodném rozpouštědle (např. směs etanolu a Tweenu-60, nebo 80), před aplikací se dále ředí vodou, nebo fyziologickým roztokem. Doporučuje se nepoužívat dimetylsulfoxid (DMSO) jako vehikulum.

###### 1.2.1.3 Počet zvířat

Test má předem určenou citlivost. Spontánní frekvence mutací v kontrolní skupině významně ovlivňuje nutný počet ovlivněných chromozómů, které je třeba analyzovat.

###### 1.2.1.4 Způsob aplikace

Expozice testované látky se uskutečňuje per os, injekčně, nebo expozicí plynům nebo parám. Zkrmování testované látky se provádí v cukerném roztoku. Je-li to nutné, testovaná látka se rozpustí v 0,7 % roztoku NaCl a injikuje se do hrudní nebo břišní dutiny.

### 1.2.1.5 *Negativní a pozitivní kontroly*

V každém pokusu se zařazují negativní (s rozpouštědlem) a pozitivní kontroly. Jestliže má laboratoř k dispozici vhodné historické kontrolní údaje, není třeba zařazovat do experimentu souběžné kontroly.

### 1.2.1.6 *Dávkování*

Používají se tři dávky testované látky. Pro předběžný orientační odhad se používá jedna dávka rovnající se maximální tolerované koncentraci, nebo vyvolávající známky toxicity. Netoxické látky se testují v nejvyšší dosažitelné dávce.

### 1.2.2 Popis postupu

Samci divokého typu (ve stáří 3-5 dnů) jsou ovlivněni testovanou látkou a individuálně kříženi s virginními samicemi z linie Muller-5 nebo z jiné vhodné markerové linie (vícenásobná inverse X-chromozómu). Samice jsou vyměněny za čerstvé virginní samice každé dva až tři dny aby byl pokryt celý buněčný cyklus zárodečných buněk. U potomků těchto samic je sledován letální efekt korespondující s účinkem testované látky v době expozice na zralé spermie, na spermatidy ve středním, nebo pozdním stádiu, časně spermatidy, spermatocyty a spermatogonie.

Heterozygotní  $F_1$  samice narozené z tohoto křížení jsou dále kříženy individuálně (t.j. jedna samice/zkumavku) se svými bratry. V  $F_2$  generaci je v každé kultuře zaznamenávána absence samců divokého typu. Jestliže v kultuře vznikají  $F_1$  samice nesoucí letální mutaci v rodičovském X-chromozómu ( nejsou nalezeni žádní samci s ovlivněným chromozómem), dcery těchto samic se stejným genotypem jsou dále testovány aby se zjistilo, zda letalita se opakuje v dalších generacích.

## 2. ÚDAJE

Získané údaje se zpracují do formy tabulky. Uvádí se počet hodnocených X-chromozómů, počet afertilních samců a počet chromozómů s letální mutací pro každou koncentraci, pro každé období křížení a pro každého testovaného samce. Zaznamenává se počet clusterů různých velikostí pro každého samce. Výsledky se mají potvrdit v nezávislém experimentu.

Údaje se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Nahromadění recesivních letálních mutací vzniklých v jednom samci má být vzato v úvahu a zhodnoceno vhodným statistickým způsobem.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

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

- použitých liniích, nebo kmenech *Drosophily*, věku, počtu ovlivněných samců, počtu sterilních samců, počtu vzniklých  $F_2$  kultur, počtu  $F_2$  kultur bez potomků, počtu chromozómů nesoucích letální mutaci pro každé stádium zárodečných buněk,
- kritériích pro velikost ovlivněných skupin,

- podmínkách testu: detailní popis ovlivňování a schéma odběru vzorků, výše dávek, údaje o toxicitě, negativní (s rozpouštědlem) a pozitivní kontroly,
- kritériích počítání letálních mutací,
- vztahu expozice/účinek, je-li to možné,
- hodnocení údajů,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## B.21 TEST TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK - IN VITRO

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Savčí buňky lze použít pro detekci fenotypických změn *in vitro* indukovaných chemickými látkami spojených s maligní transformací *in vivo*. Nejčastěji se používají buňky C3H10T1/2, 3T3, SHE, Fischerových potkanů a test se opírá o změny buněčné morfolgie, tvorbu ložisek, nebo změny v uchycení v semisolidním agaru. Méně se používají systémy detekující ostatní fyziologické či morfologické změny v buňkách po expozici karcinogenním látkám. Žádný výsledek *in vitro* testu není důkazem karcinogenity. Některé systémy jsou schopné detekce promotorů. Cytotoxicita může být zjištěna hodnocením účinku testované látky na schopnost vytvářet kolonie (cloning efficiency), nebo ovlivněním rychlosti růstu kultury. Při hodnocení cytotoxicity se vychází ze skutečnosti, že expozice testované látky byla toxikologicky relevantní, ale přesto ji nelze použít k určení frekvence transformace ve všech experimentech, protože u některých mohlo dojít k prodloužení inkubace, nebo k replatingu.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

###### 1.2.1.1 Buňky

Existuje řada buněčných linií a primokultur použitelných k testu transformace. Experimentátor musí zajistit, že buňky použité v testu transformace vykazují příslušné fenotypické změny po expozici známým karcinogenem a že test používaný laboratoří je ověřen a že je dokumentována jeho oprávněnost a spolehlivost.

###### 1.2.1.2 Médium

Použitá média a experimentální podmínky musí být vhodné pro použitý test transformace.

###### 1.2.1.3 Testované látky

Testované látky se rozpouštějí, nebo suspendují v kultivačním médiu, nebo ve vhodném rozpouštědle před ovlivněním buněk. Konečná koncentrace rozpouštědla v kultuře nesmí ovlivnit životnost buněk, růstovou rychlost nebo výskyt transformace.

###### 1.2.1.4 Metabolická aktivace

Buňky jsou exponovány testované látky v přítomnosti a bez přítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Alternativně mohou být použity buňky s vlastní metabolickou aktivitou, jestliže její vlastnosti jsou vhodné pro testované látky.

## 1.2.2 Experimentální podmínky

### 1.2.2.1 *Negativní a pozitivní kontroly*

Do každého experimentu musí být zařazeny pozitivní kontroly s použitím látek přímo působících, i vyžadujících metabolickou aktivaci. Musí být zařazeny také negativní kontroly (s rozpouštědlem).

Příklady látek pro pozitivní kontroly:

- přímo působící látky: etylmetansulfonát,  $\beta$ -propiolakton,
- látky vyžadující metabolickou aktivaci: 2-acetylaminofluoren, 4-dimetylaminoazobenzen, 7,12-dimetylbengantracen.

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

### 1.2.2.2 *Koncentrace*

Testují se nejméně tři dávky. Tyto koncentrace musí vyvolávat toxický efekt závislý na koncentraci, nejvyšší koncentrace způsobují nízkou úroveň přežívání buněk, v nejnižší koncentraci je přežívání buněk přibližně stejné jako v negativní kontrole. 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

Buňky musí být exponovány dostatečnou dobu závislou na použitém testovacím systému. Ta může zahrnovat i opakovanou expozici testované látky spojenou s výměnou média (ev. výměnou čerstvé metabolické aktivační směsi) jestliže se jedná o prodlouženou expozici. Buňky bez dostatečné vlastní metabolické aktivity musí být exponovány testované látce v přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expozice je z buněk propláchnutím odstraněna testovaná látka a kultivace probíhá dále za vhodných podmínek pro transformaci. Pak je zaznamenáván výskyt transformace. Všechny výsledky musí být ověřeny v nezávislých experimentech.

## 2. ÚDAJE

Údaje musí být prezentovány v tabulkové formě. Je vhodné vyjadřovat přežívání buněk jako procento kontrolní úrovně a frekvenci transformací jako počet transformací na počet přežívajících buněk. Data je třeba zpracovat 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, metodách použitých k udržování kultury, počtu kultur,
- kultivačních podmínkách: koncentraci testované látky, době inkubace, rozpouštědle, kultivačních nádobách, délce a frekvenci expozice, metabolickém aktivačním systému, pozitivních a negativních kontrolách, hustotě buněk během

expozice, specifikaci sledovaného fenotypu, použití selektivního systému (je-li to vhodné), zdůvodnění výběru koncentrací,

- metodách vyčíslení živých a transformovaných buněk,
- statistickém vyhodnocení,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## **B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ TEST U HLODAVCŮ**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Dominantní letalita způsobuje embryonální, nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici chemické látky dokazuje, že tato látka poškozují zárodečné tkáně exponovaného zvířecího druhu. Obecně se přijímá, že dominantní letální mutace jsou způsobeny poškozením chromozómů (strukturální a numerické abnormality). Smrt embrya exponované samice může být také výsledkem toxického účinku.

Samci jsou exponováni testované látky a páření s neovlivněnými, intaktními samicemi. Vzestup mrtvých implantací na samičku v exponované skupině nad počet mrtvých implantací v kontrolní skupině vyjadřuje postimplantační ztráty. Preimplantační ztráty se hodnotí na základě počtu žlutých tělísek, nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině. Celková dominantní letalita je součet pre- a postimplantačních ztrát. Výpočet celkové dominantní letality je založen na srovnání živých implantací na samici v exponované skupině k živým implantacím na samici v kontrolní skupině. Snížení počtu implantací v některém intervalu může být způsobeno zánikem buněk (t.j. spermatocytů a/nebo spermatogonií).

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testovanou látku rozpustit, nebo suspendovat ve fyziologickém roztoku. Látky nerozpustné ve vodě se ředí, nebo suspendují ve vhodném rozpouštědle. Použité rozpouštědlo nesmí reagovat s testovanou látkou ani vyvolávat toxické účinky. Před aplikací je třeba připravovat čerstvě naředěnou testovanou látku.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Způsob aplikace

Testovaná látka se obvykle podává pouze jednou. Na základě toxikologických informací je možné podávat látku opakovaně. Obvyklý způsob aplikace je orální sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

###### 1.2.2.2 Experimentální zvířata

Pro test se doporučují použít potkani, nebo myši. Zdravá, pohlavně dospělá zvířata jsou náhodně rozdělena na exponované a kontrolní skupiny.

###### 1.2.2.3 Počet a pohlaví

Je třeba použít dostatečný počet exponovaných samců s ohledem na spontánní variabilitu hodnocené biologické charakteristiky. Počet se řídí předem zjištěnou

detekční citlivostí a silou statistického testu. V typickém případě se na příklad volí takový počet samců, aby se dosáhlo 30 - 50 březích samic na připouštěcí interval.

#### 1.2.2.4 *Negativní a pozitivní kontroly*

Positivní a negativní (s rozpouštědlem) kontroly musí být zařazeny do každého experimentu. Jestliže však má laboratoř k dispozici přijatelné výsledky pozitivních kontrol z nedávných experimentů, mohou být použity. Látky pro pozitivní kontroly musí být použity ve vhodných, nízkých dávkách aby byla prokázána citlivost testu (např. MMS, intraperitoneálně, 10 mg.kg<sup>-1</sup>).

#### 1.2.2.5 *Dávkování*

Nejčastěji se používají tři dávkové hladiny. Nejvyšší dávka má vyvolávat známky toxicity, nebo snížené fertility u exponovaných zvířat. V některých případech je postačující jedna vysoká dávka.

#### 1.2.2.6 *Limitní test*

Netoxické látky se podávají v jedné dávce 5 g.kg<sup>-1</sup>, nebo v dávce 1 g.kg<sup>-1</sup>.den<sup>-1</sup> při opakované aplikaci.

### 1.2.3 Popis postupu

Existuje několik postupů. Nejčastěji se používá jednorázová aplikace. Může však být použito jiné schéma.

Jeden samec je opakovaně křížen s jednou, nebo dvěma neovlivněnými, intaktními samičkami ve vhodných intervalech po aplikaci látky. Samičky musí být u samců nejméně po dobu trvání jednoho cyklu říje, nebo pokud se neprokáží spermie ve vagině, či vaginální zátka.

Počet páření po expozici je dán schématem expozice a musí zahrnovat všechna stadia zárodečných buněk sledovaných po expozici.

Samice jsou utraceny cervikální dislokací ve druhé polovině březosti a obsah dělohy je vyšetřen k určení počtu mrtvých a živých implantací. Vaječníky musí být vyšetřeny k určení počtu žlutých tělísek.

## 2. ÚDAJE

Údaje o počtu samců, počtu březích samic, a počtu nezabřezlých samic jsou uváděny v tabulkách. Výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice jsou uváděny samostatně. Každá samice musí mít záznam o týdnu páření, o dávce podané samci, o počtu živých a mrtvých implantací.

Zhodnocení celkového dominantního letálního efektu je založeno na srovnání počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací v kontrolní skupině. Poměr mrtvých ku živým implantacím v exponované skupině ke stejnému poměru v kontrolní skupině po analýze vypovídá o postimplantačních ztrátách.

V tabulce musí být jasně odlišeny časná a pozdní letalita. Musí být zaznamenány i preimplantační ztráty. Ty mohou být vypočítány jako rozdíl mezi počtem *corpora lutea* a počtem implantací, nebo jako snížení průměrného počtu implantací na dělohu ve srovnání s kontrolou.



Údaje jsou vyhodnoceny vhodnými statistickými metodami.

### 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

#### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

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

- druhu, kmeni, věku a váze zvířat, počet zvířat od každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,
- testované látky, rozpouštědla, dávkových hladinách a důvodech jejich výběru, negativních a pozitivních kontrolách, údajích o toxicitě,
- způsobu podání a schematu expozice,
- schéma páření,
- metodách k průkazu páření,
- doba usmrcení,
- kritéria pro počítání dominantních letálních efektů,
- vztah dávka/odpověď,
- statistické hodnocení,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.23 CYTOGENETICKÁ ANALÝZA SAVČÍCH ZÁRODEČNÝCH BUNĚK IN VIVO**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Tento cytogenetický test *in vivo* detekuje strukturální chromozómové aberace ve spermatogoniích. Je založen na analýze mitóz spermatogonií z hlediska chromatidových a chromozómových typů aberací.

V metodě se používají preparáty z testes savců, kteří byli exponováni testované látky vhodným způsobem a usmrceni v různých intervalech. Zvířata jsou před usmrcením ovlivněna inhibitorem dělicího vřeténka, jako je kolchicín, k nahromadění buněk ve stádiu metafáze (C - metafáze). Jsou zhotoveny mikroskopické preparáty, usušeny na vzduchu, obarveny a analyzovány v mikroskopu.

Analýza spermatocytů v diakinézi (metafáze I) pro hodnocení mnohočetných translokací po ovlivnění kmenových buněk spermatogonií může poskytnout další užitečné informace.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky jsou rozpuštěny v isotonickém fyziologickém roztoku. Jestliže jsou nerozpustné, jsou rozpuštěny, nebo suspendovány ve vhodném rozpouštědle. Používají se čerstvě připravené roztoky testované látky. Jestliže bylo použito rozpouštědlo pro usnadnění dávkování látky, nesmí reagovat s testovanou látkou, nebo vyvolávat toxické účinky.

##### 1.2.1.1 Způsob aplikace

Testované látky se většinou podávají pouze jednou. Opakovaná aplikace může být použita na základě toxikologických informací. Opakovaná aplikace však může být použita jen v případě, že testovaná látka nevyvolává větší cytotoxický efekt v diferencujících se spermatogoniích.

Obvyklý způsob podání je orální aplikace sondou a intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i ostatní způsoby aplikace.

##### 1.2.1.2 Experimentální zvířata

Nejčastěji se používají myši a čínský křeček. Mohou však být použity i jiné savčí druhy.

Pohlavně dospělí samci jsou náhodným výběrem rozděleni do exponovaných a kontrolních skupin.

### 1.2.1.3 Počet zvířat

Pro exponované i kontrolní skupiny se použije nejméně po pěti samcích.

### 1.2.1.4 Negativní a pozitivní kontroly

V každém experimentu musí být použity současně pozitivní i negativní (s rozpouštědlem) kontroly.

Látky pro pozitivní kontroly musí být použity ve vhodných nízkých dávkách (např. mitomycin C, intraperitoneálně,  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) k průkazu citlivosti testu.

### 1.2.1.5 Dávkování

Používá se jedna dávka testované látky. Tato dávka má být maximální tolerovanou dávkou, nebo dávkou vyvolávající známky toxicity. Je-li třeba učit závislost dávka/odpověď, pak je třeba použít nejméně tři dávek (např. k potvrzení slabě pozitivní odpovědi). Netoxické látky se testují v nejvyšší dosažitelné dávce jak pro jednorázovou, tak i pro opakovanou aplikaci.

## 1.2.2 Popis postupu

Zvířata jsou většinou ovlivněna testovanou látkou pouze jednou. Ve skupinách exponovaných nejvyšší dávce se po expozici odebírají vzorky nejméně ve třech intervalech. Základní interval je 24 h. Jestliže kinetika buněčného cyklu může být ovlivněna testovanou látkou, používají se jeden dřívější a jeden pozdější odběrový interval stejnoměrně rozdělené v rozmezí od 6 do 48 h. Při použití dalších dávkových hladin je třeba vzorky odebrat v nejcitlivějším intervalu, pokud není znám, pak 24 h po aplikaci.

Alternativně může být použita opakovaná aplikace a zvířata jsou pak usmrcena 24 h po poslední aplikaci. Mohou být použity další odběrové časy v rozmezí od 6 do 24 h.

### 1.2.2.1 Příprava preparátů z testes

Před analýzou mitóz spermatogonií je zvířatům infikován intraperitoneálně ve vhodné dávce inhibitor mitózy, např. kolchicín. Ve vhodném intervalu jsou potom zvířata usmrcena. U myši se tento interval pohybuje mezi třemi až pěti hodinami, u čínského křečka více než pět hodin.

Používá se metoda sušených preparátů (air-drying). Různé druhy zvířat vyžadují modifikaci standardního postupu. Získaná buněčná suspenze je hypotonizována a fixována. Buňky jsou rozprostřeny na sklíčko a obarveny. Preparáty jsou před analýzou zakódovány.

### 1.2.2.2 Analýza

Na strukturální chromozómové aberace je analyzováno nejméně 100 dobře rozprostřených metafází s plným počtem centromer. Ke zhodnocení možného cytotoxického efektu se počítá poměr mitóz spermatogonií k prvním a druhým meiotickým metafázím z celého vzorku 100 dělících se buněk na zvíře.

## 2. ÚDAJE

Získané údaje jsou presentovány tabulkovou formou. Pro každé exponované a kontrolní zvíře se všechny typy aberací uvádějí samostatně. Uvádí se celkový počet analyzovaných buněk a celkový počet aberantních buněk na každou skupinu. Pro každý parametr se uvádí průměr a směrodatná odchylka. Je-li to stanoveno, uvádí se v tabulce pro každou exponovanou a kontrolní skupinu průměr poměru mitóz spermatogonií k prvním a druhým meiotickým metafázím.

Všechny údaje jsou zhodnoceny vhodnou statistickou metodou.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

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

- druhu a kmeni samců, věku a váze samců,
- počtu zvířat v každé exponované a kontrolní skupině,
- podmínkách experimentu, detailní popis ovlivňování zvířat, dávkové hladiny, rozpouštědla, inhibitor dělicího vřeténka,
- počtu analyzovaných buněk pro každé zvíře v každé skupině,
- typu a počtu aberací u každého exponovaného a kontrolního zvířete
- statistickém hodnocení
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## B.24 SPOT TEST U MYŠÍ

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Je to *in vivo* test na myších, u kterých jsou vyvíjející se embrya exponována chemickým látkám. Cílovými buňkami u embryí jsou melanoblasty a cílovými geny ty, které kontrolují pigmentaci srsti. Embrya jsou heterozygoti pro řadu genů ovlivňujících barvu srsti. Mutace, nebo ztráty dominantních allel v genech melanoblastů jsou vyjádřeny recesivním fenotypem v dceřiných buňkách vytvářejících skvrny (spots) pozměněné barvy srsti narozených myší. Počet potomků s těmito skvrnami, mutacemi, je zaznamenán a jejich frekvence je srovnávána s frekvencí u potomků z kontrol. Myší spot test detekuje především somatické mutace v embryonálních buňkách.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky jsou rozpuštěny, nebo suspendovány v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky nerozpustné ve vodě jsou rozpuštěny, nebo suspendovány ve vhodném rozpouštědle. Použitá rozpouštědla nesmí reagovat s testovanou látkou, nebo vyvolávat toxický efekt. Používají se čerstvě připravené roztoky testované látky.

##### 1.2.1.1 Experimentální zvířata

Myši kmene T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye,  $c^{ch}$  p/ $c^{ch}$  p; brown, b/b; dilute, shon ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) jsou kříženy buď s kmenem HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) nebo s kmenem C57 BL (nonagouti, a/a).

Mohou být použita i jiná křížení, za předpokladu že budou vznikat nonagouti potomci. Např. křížení mezi kmenem NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) a DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d).

##### 1.2.1.2 Počet a pohlaví zvířat

Použije se dostatečný počet zabřezlých samic, aby byl zajištěn dostatečný počet živých potomků pro každou použitou dávku. Vhodná velikost vzorku je závislá na počtu skvrn pozorovaných u ovlivněných myší a u kontrolních myší. Negativní výsledky jsou akceptovány pouze v případě, že bylo hodnoceno nejméně 300 potomků samic ovlivněných nejvyšší dávkou.

##### 1.2.1.3 Negativní a pozitivní kontroly

Musí být použity kontroly ovlivněné pouze rozpouštědlem (negativní kontroly. Ke zvýšení citlivosti testu mohou být použity kontrolní hodnoty z téže laboratoře za předpokladu, že jsou homogenní. Nedávné údaje z pozitivních kontrol získané

v téže laboratoři při expozici látky se známým mutagenním účinkem mohou být v tomto testu použity, jestliže u testované látky nebyla mutagenita detekována.

#### 1.2.1.4 Způsob aplikace

Obvykle se používá orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce březí myši. Je-li to vhodné, je možné použít inhalační, nebo jiný způsob aplikace.

#### 1.2.1.5 Dávkování

Používají se nejméně dvě dávky z nichž jedna vyvolává známky toxicity nebo zmenšení velikosti vrhu.

#### 1.2.2 Popis postupu

Zvířata jsou obvykle ovlivněna testovanou látkou pouze jednou 8., 9., nebo 10. den březosti, přičemž za 1.den březosti se považuje den zjištění vaginální zátky. Tyto dny odpovídají 7.25, 8.25 a 9.25 dnů po koncepci. Opakované ovlivnění látkou lze provést během těchto dnů.

##### *Analýza*

U mlád'at je počítán a zaznamenáván počet skvrn mezi třetím a čtvrtým týdnem po porodu. Rozlišují se tři třídy skvrn :

(a) bílé skvrny v rozsahu 5 mm ve střední ventrální linii o kterých se předpokládá, že vznikly zánikem buněk (WMVS);

(b) žluté skvrny typu agouti, se vyskytují v okolí mléčných žláz, genitálií, hrdla, axil, oblasti slabín a uprostřed čela, a předpokládá se, že vznikají v důsledku chybné diferenciaci (MDS);

(c) zbarvené a bílé skvrny náhodně rozmístěné v srsti jako výsledek somatických mutací (RS).

Všechny tři skupiny jsou zaznamenávány, ale pouze poslední, RS, je geneticky relevantní. Obtíže s odlišením mezi MDS a RS je možné vyřešit pozorováním chlupů ve fluorescenčním mikroskopu.

Zaznamenávají se nápadné, velké morfologické malformace potomků.

## 2. ÚDAJE

Získaná data jsou uváděna jako celkový počet sledovaných potomků a počet mlád'at majících jednu, nebo více skvrn vyvolaných somatickými mutacemi. Údaje získané z kontrolních a exponovaných skupin se porovnávají vhodnými metodami. Údaje jsou také uváděny jako získané hodnoty na vrh.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

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

- kmeni použitým při křížení,
- počtu zabřezlých samic v experimentální a v kontrolní skupině,

- průměrné velikosti vrhu v experimentální a v kontrolní skupině při porodu a při odstavení,
- dávkových úrovních testované látky,
- použitém rozpouštědle,
- ve kterém dni březosti byla testovaná látka aplikována,
- o způsobu podání testované látky,
- celkovém počtu sledovaných potomků, a jejich počet s WMVS, MDS a RS v experimentální a kontrolní skupině,
- hrubých morfologických malformací,
- vztahu dávka/odpověď u RS, je-li to možné,
- statistickém hodnocení,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.

## B.25 PŘENOSNÉ TRANSLOKACE U MYŠÍ

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Test na přenosné translokace u myši detekuje strukturální a numerické chromozómové změny v savčích zárodečných buňkách zachycené v první generaci potomků. Indukované změny jsou reciproké translokace a u samic ještě ztráty X-chromozómu. Nositelé translokací a XO-samice vykazují sníženou fertilitu, která se využívá pro výběr  $F_1$  potomstva pro cytogenetickou analýzu. Úplná sterilita je způsobena některými typy translokací (X-autosom a c-t typ). Translokace jsou analyzovány mikroskopicky v meiotických buňkách samců ze spermatocytů ve stadiu diakinézy-metafáze I, nebo  $F_1$  samců či samčích potomků  $F_1$  samic. Samice XO jsou cytogeneticky identifikovány přítomností pouze 39 chromozómů v mitózách z kostní dřeně.

#### 1.2 Popis metody

##### 1.2.1 Příprava

Testované látky jsou rozpuštěny v isotonickém fyziologickém roztoku. Jestliže jsou nerozpustné, jsou rozpuštěny, nebo suspendovány ve vhodném rozpouštědle. Používají se čerstvě připravené roztoky testované látky. Jestliže bylo použito rozpouštědlo pro usnadnění dávkování látky, nesmí reagovat s testovanou látkou, nebo vyvolávat toxické účinky.

##### 1.2.1.1 Způsob aplikace

Aplikuje se obvykle orálně sondou, nebo intraperitoneální injekcí. Mohou být použity i jiné vhodné způsoby aplikace.

##### 1.2.1.2 Experimentální zvířata

Pro snadnější křížení a cytologickou verifikaci se pokusy provádí na myších. Nepožaduje se žádný specifický kmen. Průměrná velikost vrhu by měla být větší než osm a měla by být relativně konstantní. Používají se zdravá, pohlavně dospělá zvířata.

##### 1.2.1.3 Počet zvířat

Počet zvířat nutně závisí na frekvenci spontánních translokací a na minimálním počtu indukovaných translokací vyžadovaném pro pozitivní kontrolu.

Test se obvykle provádí analýzou samců  $F_1$  potomků. Nejméně 500 samců v  $F_1$  generaci je testováno v každé exponované skupině. Jestliže budou analyzovány také samice  $F_1$  generace potomků, pak se vyžaduje 300 samců a 300 samic.



#### 1.2.1.4 *Negativní a pozitivní kontroly*

Mohou se použít adekvátní výsledky kontrol získané z předchozích pokusů. Jestliže jsou dostupné přijatelné výsledky pozitivních kontrol z nedávného pokusu z téže laboratoře, mohou být použity.

#### 1.2.1.5 *Dávkování*

Používá se jedna dávka, obvykle nejvyšší dávka vyvolávající minimální toxický efekt ale bez vlivu na reprodukční chování nebo přežívání. Pro stanovení vztahu dávka/odpověď je třeba dvou dalších, nižších dávek. U netoxických látek se použije nejvyšší dosažitelná dávka.

### 1.2.2 Popis postupu

#### 1.2.2.1 *Expozice a oplodnění*

Používají se dva způsoby expozice. Nejčastěji se používá jedna aplikace testované látky. Také je možná varianta podávání testované látky sedm dní v týdnu po 35 dnů.

Počet oplodnění po expozici je řízen schématem experimentu a musí zajistit, že všechna buněčná stádia zárodečných buněk budou analyzována. Na konci období oplodňování jsou samice samostatně rozděleny do klecí. Po porodu je třeba zaznamenat datum, velikost vrhu a pohlaví mlád'at. Po vrhu jsou samčí i samičí potomci odděleni až do doby zařazení do experimentu.

#### 1.2.2.2 *Zjišťování translokačních heterozygotů*

Používá se jedna ze dvou možných metod. Test fertility  $F_1$  potomků a následná verifikace možných nositelů translokací cytogenetickou analýzou nebo cytogenetická analýza všech samců  $F_1$  generace bez předchozího výběru pomocí testu fertility.

##### (a) Test fertility

Snížená fertilita zvířat v  $F_1$  generaci se může stanovit z velikosti vrhu a/nebo analýzou obsahu dělohy samic. Kritéria určení normální a snížené fertility musí být stanovena pro každý kmen použitých myší.

*Velikost vrhu:*  $F_1$  samci určené k testování jsou odděleny samostatně do klecí se samicemi ze stejného experimentu, nebo stejné skupiny. Klece jsou kontrolovány denně počínaje 18. dnem po oplodnění. Velikost vrhu a pohlaví  $F_2$  potomků jsou zaznamenány při porodu, hned poté jsou odděleni. Jestliže jsou testovány  $F_1$  samice,  $F_2$  potomci malých vrhů jsou uchovávaní pro další testy. Samice-nositelky translokací jsou verifikovány cytogenetickou analýzou translokací u jakéhokoliv jejich mužského potomka.  $X_0$ -samice jsou určeny změnou sex ratio mezi jejich potomky z 1:1 na 1:2 samci vs. samice. V následném kroku jsou normální  $F_1$  zvířata vyřazena z dalšího testování jestliže první  $F_2$  vrh dosahuje, nebo převyšuje předem určenou normální hodnotu, jinak jsou zaznamenány druhé a třetí vrhy.  $F_1$  zvířata která nemohou být klasifikována jako normální po vyhodnocení tří  $F_2$  vrhů, jsou dále testována buď analýzou obsahu dělohy, nebo jsou přímo podrobena cytogenetické analýze.

*Analýzy obsahu dělohy:* Redukce velikostí vrhu u nosičů translokací je způsobena smrtí embryí, takže vysoký počet mrtvých implantací indikuje přítomnost

translokací u testovaných zvířat. Testovaní  $F_1$  samci jsou připouštěni každý ke 2 - 3 samicím. Oplodnění se zjišťuje denní ranní kontrolou vaginální zátky. Samice jsou usmrceny 14. -16.den a jsou zaznamenány živé a mrtvé zárodky.

#### (b) Cytogenetická analýza

Metodou air-drying jsou připraveny preparáty z testes. Nosiči translokací jsou určeni na základě přítomnosti multivalentních figur ve stádiu diakinézy - metafáze I v primárních spermatocytech. Nález nejméně dvou buněk s multivalentními asociacemi splňuje požadovaný důkaz, že testované zvíře je nositelem translokace. Jestliže byl proveden výběr no breeding, všichni  $F_1$  samci jsou vyšetřeni cytogeneticky. Na každého samce musí být mikroskopicky vyšetřeno nejméně 25 buněk v diakinéze - metafáze I. Analýza mitotických metafází ve spermatogoniích nebo v kostní dřeni se vyžaduje u samců s malými testes a potlačením meiozy před diakinézou, nebo u  $F_1$  samic suspektních X0. Přítomnost neobvykle dlouhého a/nebo krátkého chromozómu v každé z 10 buněk je důkazem pro částečnou samčí translokační sterilitu (c-t typ). Některé X-autosomální translokace způsobující samčí sterilitu mohou být identifikovány pouze pruhováním mitotických chromozómů. Přítomnost 39 chromozómů ve všech 10 mitózách je důkazem pro X0 samice.

## 2. ÚDAJE

Získané údaje jsou presentovány tabulkovou formou.

Pro každý interval připouštění je zaznamenána průměrná velikost vrhu a poměr pohlaví (sex ratio).

Pro odhad fertility  $F_1$  zvířat se uvádí průměrná velikost vrhu kontroly a individuální velikosti vrhů  $F_1$  nosičů translokací. Pro analýzu obsahů dělohy se uvádí průměrný počet živých a mrtvých zárodků v kontrole a individuální počty živých a mrtvých zárodků pro každé připouštění  $F_1$  nosičů translokací.

Při cytogenetické analýze diakinéze-metafáze I se uvádí počet typů multivalentních figur a celkový počet buněk pro každého nosiče translokací.

Pro  $F_1$  sterilní jedince se zaznamenává počet a doba připouštění. Dále se uvádí váha testes a podrobnosti o cytogenetické analýze.

U X0 samic se uvádí průměrná velikost vrhu, sex ratio  $F_2$  potomků a výsledky cytogenetické analýzy.

V případě, že pomocí testů fertility byly předběžně vybráni možní nositelé  $F_1$  translokací, je třeba v tabulkách uvést informaci o skutečném počtu potvrzených translokačních heterozygotů.

Musí být uvedeny údaje o negativních a pozitivních kontrolách.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

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

- kmenu myší, stáří a váze exponovaných zvířat,

- počtu rodičovských zvířat pro každé pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,

- experimentálních podmínkách, detailní popis ovlivňování zvířat, dávkové hladiny, rozpouštědla a schéma připouštění
- počtu a pohlaví mláďat na samici, počet a pohlaví potomků chovaných pro analýzu translokací,
- době a kritériích analýzy translokací,
- počet a detailní popis nosičů translokací, včetně údajů o březosti a obsahu dělohy,
- popis cytogenetické metody a mikroskopické analýzy, pokud možno s obrázky,
- statistické hodnocení,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.26 SUBCHRONICKÁ TOXICITA ORÁLNÍ**

(90denní opakované podávání per os, studie na hlodavcích)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává denně orálně po 90 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 přežijí do konce 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 dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin.

Testovanou látku lze podávat v potravě, sondou, v kapslích nebo v pitné vodě. Všem zvířatům se testovaná látka podává po celou dobu pokusu stejnou metodou. Pokud se užije pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná aditiva, musí být o nich známo, že nemají toxický účinek. Existují-li vhodná dřívější data, je možno je využít.

##### 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. V ideálním případě by na počátku podávání látky měli být potkani mladší než 6 týdnů, v žádném případě starší než 8 týdnů. Na začátku studie by nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit  $\pm 20\%$  střední hodnoty. Provádí-li se subchronický orální test jako předběžný test před dlouhodobým testem, v obou studiích se má použít stejný živočišný druh a kmen.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou hladinu dávek použít nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 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 podávat další skupině (satelitní skupině) 20ti zvířat (10 zvířat každého pohlaví) po dobu 90dnů nejvyšší dávku a během následujících 28 dnů po podávání sledovat vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

### 1.2.2.3 *Dávkování*

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. Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxické účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí nebo jen malý počet. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady 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 voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky.

Ve skupině s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by počet uhynutí měl být nízký, jinak je vyhodnocení výsledků obtížné.

Podává-li se testovaná látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm nebo  $\text{mg.kg}^{-1}$  potravy) 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 v pravidelných intervalech (týdenních nebo čtrnáctidenních) přizpůsobovat změnám tělesné hmotnosti zvířete.

### 1.2.2.4 *Limitní test*

Provede-li se 90-denní test níže popsanou metodou a nevyvolá-li aplikace dávky  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti za den (nebo dávky vyšší - odpovídající možné expozici člověka, je-li tato známa) žádné toxické účinky, je možno od dalšího testování upustit. Podává-li se málo toxická látka v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství ani další vlastnosti testované látky nebránily normální výživě zvířat.

### 1.2.2.5 *Doba pozorování*

Všechna zvířata je třeba denně pozorovat a zaznamenávat toxické účinky, jejich dobu objevení, stupeň a trvání. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a čas, ve kterém se objeví a opět odezní toxické účinky.

### 1.2.3 *Popis postupu*

V ideálním případě se zvířatům podává testovaná látka 7 dní v týdnu po dobu 90dnů. Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, jsou pozorována dalších 28 dnů bez aplikace, k posouzení zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků.

Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Příjem potravy (a příjem vody při podávání testované látky v pitné vodě) a hmotnost zvířat se zaznamenávají týdně.

Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu 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 je třeba okamžitě vyřadit, humánně utratit a pitvat.

U všech zvířat včetně kontrolních se běžně provádějí následující vyšetření:

(a) Oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem se má provést před podáváním testované látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, ale alespoň u nejvyšší dávky a u kontrolních skupin. Najdou-li se oční změny, vyšetří se všechna zvířata.

(b) Na konci pokusu se má provést hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve jako například dobu srážlivosti, protrombinový čas (Quickův), trombinový čas či počet trombocytů.

(c) Na konci pokusu se má provést biochemická analýza krve. Pro všechny studie je vhodné stanovit koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických testů je určen pozorováním způsobu účinku látky. Doporučuje se stanovovat vápník, fosfor, chloridy, sodík, draslík, glukózu na lačno (trvání doby hladovění se volí podle živočišného druhu a kmene), alaninaminotransferasa (dříve pyruvát-transaminasa) a aspartátaminotransferasa séra (dříve glutamát-oxalacetát-transaminasa), ornithin dekarboxyláza, gama-glutamyltranspeptidáza, dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru. Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení: lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro studium širšího spektra účinků.

(d) Analýza moče se nevyžaduje jako běžný postup, ale jen na podkladě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou přiměřená historická kontrolní data, má se uvážit stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před podáváním.

#### 1.2.3.1 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny, štítná žláza (s příštítnými tělísky) a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickým postižením, mozek - v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/ příštítná tělíska, tkáň na místě brzlíku, průdušnice a plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, varlata a vaječníky, děloha, (přídatné pohlavní orgány), (kůže), jícen, žaludek, dvanácterník, tenké, tlusté a slepé střevo, konečník, močový měchýř, lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch), páteřní mícha ve třech úrovních - krční, střed hrudní a bederní, a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se posuzují v případě, pokud lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

### 1.2.3.2 Histopatologická vyšetření

(a) Úplné histopatologické vyšetření orgánů a tkání je třeba provést u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny.

(b) Je třeba vyšetřit všechna makroskopická postižení.

(c) Je třeba vyšetřit cílové orgány v jiných dávkových skupinách.

(d) Plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se mají histopatologicky vyšetřovat k zjištění příznaků infekce, protože to poskytuje obraz zdravotního stavu zvířat. Je třeba také uvážit histopatologické vyšetření jater a ledvin u těchto skupin. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých bylo zjištěno postižení ve skupině s vysokou dávkou.

(e) Používá-li se satelitní skupiny, musí se provést histopatologické vyšetření na tkáních a orgánech, u kterých byly zjištěny účinky u ostatních exponovaných skupin.

## 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 poškozením a procentuálně počet zvířat s jednotlivými typy poškození. 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 ustájení, potrava,
- experimentální podmínky, - úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- údaje o toxických odpovědích podle pohlaví a podle dávek,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- 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 ( včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevnické nálezy,
- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.27 SUBCHRONICKÁ TOXICITA ORÁLNÍ**

(90denní opakované podávání per os, studie na nehlodavcích)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává denně orálně po 90 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat (nehlodavcům), 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 přežijí do konce 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 dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Testovanou látku lze podávat v potravě nebo může být vhodnější podávání v kapslích. Mohou být použity také jiné způsoby orální aplikace. Všem zvířatům se testovaná látka podává po celou dobu pokusu stejnou metodou. Pokud se užije pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná aditiva, musí být o nich známo, že nemají toxický účinek. Existují-li vhodná historická data, je možno je využít.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Obvykle se jako živočišný druh - nehlodavec používá pes: dává se přednost definovanému plemeni. Je možno používat i jiných druhů nehlodavců. Je třeba pracovat na mladých zdravých zvířatech; v případě psů se má s podáváním začít ve věku od 3 do 6 měsíců a ne starším než 9 měsíců. Provádí-li se subchronický orální test jako předběžný test před dlouhodobým testem, v obou studiích se má použít stejný živočišný druh a plemeno.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek použít nejméně 8 zvířat (4 samice a 4 samci). Počet zvířat na konci pokusu musí být takový, aby umožnil vyhodnocení toxických účinků.

###### 1.2.2.3 Dávkování

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. Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxické účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. Ideálně by střední úroveň dávky měla vyvolat jen toxický účinek na



hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 úrovně dávek, mají být voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky.

Ve skupině s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by k uhynutí rovněž nemělo docházet.

Podává-li se málo toxická látka v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství ani další vlastnosti testované látky nebránily normální výživě zvířat.

Podává-li se testovaná látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm nebo  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  potravy) nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitou alternativu je třeba uvést. Podává-li se látka přímo, například v kapslích, mělo by se tak dít každý den ve stejnou dobu, a dávkování v týdenních intervalech přizpůsobovat změnám tělesné hmotnosti zvířete.

Provádí-li se subchronický orální test jako předběžný test před dlouhodobým testem, v obou studiích se má použít stejná dieta.

#### 1.2.2.4 *Limitní test*

Provede-li se 90denní test níže popsanou metodou a nevyvolá-li aplikace dávky  $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti za den (nebo dávky vyšší - odpovídající možné expozici člověka, je-li tato známa) žádné toxické účinky, je možno od dalšího testování upustit. Podává-li se málo toxická látka v potravě, je třeba zajistit, aby ani aplikované množství ani další vlastnosti testované látky nebránily normální výživě zvířat.

#### 1.2.2.5 *Doba pozorování*

Všechna zvířata je třeba denně pozorovat a zaznamenávat toxické účinky, jejich dobu objevení, stupeň a trvání. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a čas, ve kterém se objeví a opět odezní toxické účinky.

#### 1.2.3 *Popis postupu*

V ideálním případě se zvířatům podává testovaná látka 7 dní v týdnu po dobu 90dnů. Podává-li se látka jiným způsobem než v potravě, považuje se za přijatelné podávat látku 5 dní v týdnu.

Pozorování zahrnuje (ale není na ně omezeno) změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování.

Příjem potravy (a příjem vody při podávání testované látky v pitné vodě) a hmotnost zvířat se zaznamenávají týdně.

Nejméně jednou denně je třeba provádět pečlivá klinická vyšetření s vhodnými opatřeními k minimalizaci ztrát zvířat pro studii. Po skončení studie se pitvají všechna zvířata, která přežila. Umírající zvířata je třeba okamžitě vyřadit, humánně utratit a pitvat.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provedou následující vyšetření:

(a) Oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem se má provést před podáváním testované látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, ale alespoň u nejvyšší dávky a u kontrolních skupin. Najdou-li se oční změny, vyšetří se všechna zvířata.

(b) Na začátku testu, a potom buď v měsíčních intervalech nebo uprostřed a dále na konci pokusu se má provést hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve jako například dobu srážlivosti, protrombinový čas (Quickův), trombinový čas či počet trombocytů.

(c) Na začátku testu, a potom buď v měsíčních intervalech nebo uprostřed a dále na konci pokusu se má provést biochemická analýza krve. Pro všechny studie je vhodné stanovit koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických testů je určen pozorováním způsobu účinku látky. Doporučuje se stanovovat vápník, fosfor, chloridy, sodík, draslík, glukózu na lačno (přičemž trvání doby hladovění se volí podle živočišného druhu a kmene), alaninamino transferasa (dříve pyruvát transaminasa séra) a aspartátamino transferasa séra (dříve glutamát-oxalacetát transaminasa), ornithin dekarboxyláza, gama-glutamyl transpeptidáza, dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru. Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení: lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro studium širšího spektra účinků. Před odběrem vzorků krve by nehlodavci měli hladovět (ne více než 24 hodin).

(d) Analýza moče se nevyžaduje jako běžný postup, ale jen na podkladě očekávané nebo pozorované toxicity.

#### 1.2.3.1 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny, štítná žláza (s příštítnými tělísky) a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickým postižením, mozek - v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza, příštítná tělíska, tkáň na místě brzlíku, (průdušnice), plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, varlata a vaječníky, děloha, (přídavné pohlavní orgány), (kůže), žlučník, jícen, žaludek, dvanácterník, tenké, tlusté a slepé střevo, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch), a (páteřní mícha ve třech úrovních - krční, střed hrudní a bederní). Tkáně v závorkách se posuzují pokud je to indikováno podle příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

#### 1.2.3.2 *Histopatologická vyšetření*

Úplné histopatologické vyšetření orgánů a v tkáni je třeba provést u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny. Histopatologické vyšetření zvířat z dalších dávkových skupin se provede na orgánech, u kterých byla nalezena poškození u skupiny s nejvyšší dávkou, nebo když je to indikováno na základě klinických pozorování.

## 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 poškozením, typy poškození a procentuálně počet zvířat s jednotlivými typy poškození. 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, plemeno nebo kmen, původ, podmínky ustájení, potrava,
- experimentální podmínky,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- údaje o toxických odpovědích podle pohlaví a podle dávek,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj, o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků, (zejména klinické nálezy),
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- spotřeba potravy a vývoj tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.28 SUBCHRONICKÁ TOXICITA DERMÁLNÍ** (90denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se aplikuje denně na kůži po 90 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 přežijí do konce 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. abrazy). 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 případně upraveny do práškové formy, je třeba zkoušenou látku dostatečně navlhčit vodou, případně vhodným vehikulem, aby byl zaručen dobrý kontakt s kůží. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěné. Látka se nanáší denně 5 až 7 dnů v týdnu.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Je možno použít dospělé potkany, králíky nebo morčata, případně 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. Provádí-li se subchronický dermální test jako předběžný test před dlouhodobým testem, v obou studiích se má použít stejný živočišný druh a kmen.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek použít nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 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) 20ti zvířat (10 zvířat každého pohlaví) po dobu 90dnů nejvyšší

dávku a během následujících 28 dnů po podávání sledovat vratnost, přetrvávání nebo pozděný výskyt toxických účinků.

#### 1.2.2.3 *Dávkování*

Je třeba použít nejméně tři hladiny 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 obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka.

Nejvyšší hladina dávky má vyvolat toxické účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí nebo jen v malém počtu. Nejnižší hladina dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. Ideálně by střední hladina dávky měla vyvolat jen toxický účinek na hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 hladiny dávek, mají být vymezené dávky voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupině s nízkou a střední hladinou dávky 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 hladiny 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  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  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 a zaznamenávat toxické účinky. Je třeba zaznamenat dobu uhynutí a čas, ve kterém se objeví a opět odezní toxické účinky.

### 1.2.3 *Popis postupu*

Zvířata se chovají v klecích po jednom. Exponují se studované látce nejlépe 7 dnů v týdnu po dobu 90 dnů. Zvířata satelitní skupiny, která jsou určena pro následné pozorování, je třeba chovat po dalších 28 dnů bez expozice, aby se mohla pozorovat reparace toxických účinků nebo jejich přetrvávání. 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 udržována v kontaktu s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Testovací 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 imobilizaci však nelze doporučit.

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

Všechna zvířata je třeba denně pozorovat a zaznamenávat příznaky otravy včetně jejich počátku, stupně a trvání.

Pozorování v kleci 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 pravidelnou kontrolu 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.

U všech zvířat včetně kontrolních se běžně provádějí následující vyšetření:

(a) Oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem se má provést před podáváním testované látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, ale alespoň u nejvyšší dávky a u kontrolních skupin. Najdou-li se oční změny, vyšetří se všechna zvířata.

(b) Na konci pokusu se má provést hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve jako například dobu srážlivosti, protrombinový čas (Quickův), trombinový čas či počet trombocytů.

(c) Na konci pokusu se má provést biochemická analýza krve. Pro všechny studie je vhodné stanovit koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických testů je určen pozorováním způsobu účinku látky. Doporučuje se stanovovat vápník, fosfor, chloridy, sodík, draslík, glukózu na lačno (příčemž trvání doby hladovění se volí podle živočišného druhu), alaninamino transferasa (dříve glutamát- pyruvát transaminasa) a aspartátamino transferasa séra (dříve glutamát-oxalacetát transaminasa), ornithin dekarboxyláza, gama-glutamyl transpeptidáza, dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru. Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení: lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro studium širšího spektra účinků.

(d) Analýza moče se nevyžaduje jako běžný postup, ale jen na podkladě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou přiměřená historická kontrolní data, má se uvážit stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem aplikace.

#### 1.2.3.1 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny, štítná žláza (s příštítnými tělísky) a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickým postižením, mozek - v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza, příštítná tělíska, tkáň na místě brzlíku, (průdušnice), plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, varlata a vaječníky, děloha, přídatné pohlavní orgány, žlučník (je-li přítomen), jícen, žaludek, dvanácterník, tenké, tlusté a slepé střevo, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), (hrudní kost s kostní dřeví), (kost stehenní včetně kloubních ploch), (pátevní mícha ve třech úrovních - krční, střed hrudní a bederní), a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se posuzují pokud je to indikováno podle příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

### 1.2.3.2 Histopatologická vyšetření

(a) Úplné histopatologické vyšetření normální a exponované kůže, orgánů a tkání je třeba provést u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny.

(b) Je třeba vyšetřit všechna makroskopická postižení.

(c) Je třeba vyšetřit cílové orgány v ostatních dávkových skupinách.

(d) Používá-li se potkanů, plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se mají histopatologicky vyšetřovat k zjištění příznaků infekce, protože to poskytuje obraz zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých bylo zjištěno postižení ve skupině s vysokou dávkou.

(e) Používá-li se satelitní skupiny, musí se provést histopatologické vyšetření na tkáních a orgánech, u kterých byly zjištěny účinky u ostatních exponovaných skupin.

## 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 lézemi a procentuálně počet zvířat

s jednotlivými typy lézí. 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 ustájení, krmení,
- podmínky pokusu,
- úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- údaje o toxických odpovědích podle pohlaví a podle dávek,

- hladina bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj, o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- spotřeba potravy a vývoj tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- hematologická vyšetření a jejich výsledky
- biochemická vyšetření a jejich výsledky ( včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.



## **B.29 SUBCHRONICKÁ TOXICITA - INHALAČNÍ** (90denní opakovaná inhalační expozice, studie na hlodavcích)

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Několik skupin pokusných zvířat je exponováno studované látce denně po určitou dobu, v odstupňovaných koncentracích, každá skupina jedné koncentraci, a to po 90 dnů. Použije-li se pro dosažení potřebné koncentrace testované látky v atmosféře vehikulum, je třeba použít kontrolní skupinu pro vehikulum. Během trvání pokusu se zvířata denně pozorují a zjišťují se příznaky toxických účinků. Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí do konce pokusu, se pitvají.

#### 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 zvířata náhodně přiřadí 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 toxický účinek. Existují-li vhodná historická data, je možno je využít.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 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. Provádí-li se subchronický inhalační test jako předběžný test před dlouhodobým testem, v obou studiích se má použít stejný druh a kmen.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou úroveň koncentrace je třeba použít nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 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 další skupinu (satelitní skupinu) 20ti zvířat (10 zvířat každého pohlaví) po dobu 90dnů nejvyšší koncentraci a během následujících 28 dnů po ukončení expozic sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

###### 1.2.2.3 Expoziční koncentrace

Použijí se nejméně tři skupiny s různou úrovní koncentrace a jedna kontrolní skupina (případně kontrolní skupina s vehikulem - pokud se použije - v koncentraci

stejně 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 toxické účinky, ale nezpůsobit žádné uhynutí nebo jen

v malém počtu. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší koncentrace tuto hodnotu překračovat. Ideálně by střední koncentrace měla vyvolat toxický účinek na hranicích zjistitelnosti. Aplikují-li se více než 3 úrovně koncentrací, mají být voleny tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupině s nízkou a střední koncentrací a v kontrolní skupině by počet uhynutí měl být nízký, jinak je vyhodnocení výsledků obtížné.

#### 1.2.2.4 *Trvání expozice*

Zvířata se exponují po dobu 6 hodin od ustavení rovnováhy koncentrace studované látky. V případě specifických požadavků je možné použít i jiných dob expozice.

#### 1.2.2.5 *Expoziční zařízení*

Pro expozici zvířat se používá dynamické inhalační 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 co nejvíce bránil shlukování zvířat a aby inhalační expozice testované látky 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.

#### 1.2.2.6 *Doba pozorování*

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

#### 1.2.3 *Popis postupu*

Zvířata se exponují testované látce denně, 5 - 7 dnů v týdnu, po dobu 90 dnů. Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, jsou pozorována dalších 28 dnů bez aplikace, k posouzení zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Teplota během experimentu má být  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Relativní vlhkost má být mezi 30 % a 70 %, s výjimkou případů, kde to není možné (např. experimenty s aerosoly). Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Používá se dynamický inhalační systém s vhodnou analytickou kontrolou koncentrace. Doporučuje se provést předběžný pokus pro získání potřebných koncentrací. Rychlost průtoku vzduchu je třeba nastavit tak, aby podmínky v celém expozičním boxu byly stejné. Systém musí zaručovat, že stabilních podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji.

Měření nebo monitorování podmínek expozice:

- a) Měření průtoku vzduchu (kontinuálně).

b) Skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zóně. 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. Při vývoji generátoru aerosolu je třeba analyzovat velikosti částic tak, aby byla získána představa o stabilitě. Během expozic se měří tak často, jak je to potřeba pro posouzení stálosti distribuce velikosti částic.

c) Teplota a vlhkost vzduchu

d) Během expozice a po ní se zvířata systematicky pozorují a zjištění se zaznamenávají; každé zvíře má svůj individuální protokol. Všechna zvířata je třeba denně pozorovat na příznaky toxických účinků a zaznamenávat jejich výskyt, stupeň a trvání. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Hmotnosti zvířat i spotřeba potravy se zaznamenávají týdně. Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu 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, pitvají. Umírající zvířata je třeba vyřadit a pitvat.

U všech zvířat včetně kontrolních se běžně provádějí následující vyšetření:

(a) Oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem se má provést před podáváním testované látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, ale přinejmenším u nejvyšší dávky a u kontrolních skupin. Najdou-li se oční změny, vyšetří se všechna zvířata.

(b) Na konci pokusu se má provést hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve jako například dobu srážlivosti, protrombinový čas (Quickův), trombinový čas či počet trombocytů.

(c) Na konci pokusu se má provést biochemická analýza krve. Pro všechny studie je vhodné stanovit koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických testů je určen pozorováním způsobu účinku látky. Doporučuje se stanovovat vápník, fosfor, chloridy, sodík, draslík, glukózu na lačno (trvání doby hladovění se volí podle živočišného druhu a kmene), alaninamino transferasa (dříve glutamát-pyruvát transaminasa) a aspartátamino transferasa séra (dříve glutamát-oxalacetát transaminasa), ornithin dekarboxyláza, gama-glutamyl transpeptidáza, dusík močoviny, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru. Mezi další charakteristiky, které mohou být potřebné pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení: lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro rozšíření spektra pozorovaných účinků.

(d) Analýza moče se nevyžaduje jako běžný postup, ale jen na podkladě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou přiměřená dřívější kontrolní data, má se uvážit stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem expozic.

### 1.2.3.1 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny, štítná žláza (s příštítnými tělísky) a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickým postižením, plíce (mají se vyjmout neporušeny, zvážit a fixovat vhodným médiem, tak aby se zachovala struktura plic - perfusní fixace se považuje za vhodnou), tkáň nasofaryngu, mozek - v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, hypofýza, štítná žláza/příštítná tělíska, tkáň na místě brzlíku, průdušnice, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, varlata a vaječníky, děloha, (přídatné pohlavní orgány), (kůže), žlučník (je-li přítomen), jícen, žaludek, dvanácterník, tenké, tlusté a slepé střevo, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch), (páteřní mícha ve třech úrovních - krční, střed hrudní a bederní). Tkáně v závorkách se posuzují pokud je to indikováno podle příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

### 1.2.3.2 Histopatologická vyšetření

(a) Úplné histopatologické vyšetření respiračního systému a ostatních orgánů a tkání je třeba provést u všech zvířat skupiny, která byla exponována nejvyšší koncentraci, a u zvířat kontrolní skupiny.

(b) Je třeba vyšetřit všechny makroskopické léze.

(c) Je třeba vyšetřit cílové orgány v ostatních dávkových skupinách.

(d) Plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední koncentrací se mají histopatologicky vyšetřovat, protože to poskytuje obraz zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých bylo zjištěno postižení ve skupině s vysokou koncentrací.

(e) Používá-li se satelitní skupiny, provede se histopatologické vyšetření na tkáních a orgánech, u kterých byly zjištěny účinky u ostatních exponovaných skupin.

## 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 lezemi, typ leze a procentuálně počet zvířat s jednotlivými typy lézí. 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 ustájení, krmení,
- 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 experimentálním 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 obsahovat tyto údaje:
  - a) rychlost průtoku vzduchu inhalačním zařízením,
  - b) teplota a vlhkost vzduchu,
  - c) nominální koncentrace (celkové množství testované látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu),
  - d) povaha vehikula, pokud bylo užito,
  - e) skutečné koncentrace v dýchací zóně,
  - f) medián velikostí částic (u aerosolu),
- údaje o toxických odpovědích podle pohlaví a podle koncentrací,
- úroveň bez účinku, pokud je možné ji stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- spotřeba potravy a vývoj tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- 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.30 TESTOVÁNÍ CHRONICKÉ TOXICITY

### 1. METODIKA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka je podávána normálně sedm dní v týdnu, vhodnou cestou, několika skupinám pokusných zvířat, jedna dávka na skupinu, po větší část života zvířat. Během a po expozici testované látky jsou zvířata denně pozorována za účelem sledování projevů toxicity.

#### 1.2 Popis testovací metody

##### 1.2.1 Příprava

Zvířata jsou chována při standardních podmínkách aspoň 5 dní před započítáním testu. Před testem jsou zdravá, mladá zvířata náhodně rozdělena do exponovaných a kontrolních skupin.

##### 1.2.2 Testovací podmínky

###### 1.2.2.1 *Experimentální zvířata*

Preferovaným druhem je potkan. Na základě předchozích studií je možno použít i další druhy (hlodavce nebo jiné). Je třeba použít zdravé a mladé jedince běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat. Expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mláďat. Na začátku studie by neměl rozdíl ve váze zvířat činit více než  $\pm 20\%$  od průměru. V případě, že vlastní studii předchází test subchronické orální toxicity, je třeba použít stejný druh a kmen v obou studiích.

###### 1.2.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky je třeba použít nejméně 40 zvířat (20 samic a 20 samců), stejně i pro kontrolní skupinu. Samice by měly být nullipary a neměly by být březí. Pokud je záměrem utratit některá zvířata před dokončením testu, je třeba použít přiměřeně vyšší počet zvířat.

V případě jiných druhů zvířat (nehlodavců) je možné použít menší počet zvířat, ale ne méně než 4 od každého pohlaví ve skupině.

###### 1.2.2.3 *Dávky a frekvence expozic*

Je třeba použít aspoň tři dávky a jednu kontrolní skupinu. Nejvyšší dávka by měla vyvolat jasné projevy toxicity bez nadměrné úmrtnosti. Nejnižší dávka by neměla vyvolat prokazatelné projevy toxicity. Střední dávky by měly být voleny ve středním pásmu mezi vysokými a nízkými dávkami. Výběr dávek by měl vzít v úvahu výsledky předchozích studií.

Obvykle jsou zvířata exponována denně. V případě, že testovaná látka je podávána v pitné vodě nebo v potravě, je třeba zajistit, aby k ní měla zvířata stálý přístup.

#### 1.2.2.4 *Kontroly*

Souběžná kontrolní skupina je identická v každém ohledu k exponované skupině, vyjma expozice testované látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly nebo použije-li se pro orální aplikaci emulgátoru, jehož biologická aktivita není charakterizována, zařadí se další negativní kontrolní skupina, která není exponována ani vehikulu.

#### 1.2.2.5 *Způsob aplikace*

Dva hlavní způsoby aplikace jsou orální a inhalační. Volba způsobu podání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách testované látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

Použití dermální aplikace vyvolává značné technické problémy. Chronická systémová toxicita v důsledku kožního vstřebání může být normálně odvozena z výsledku orálního testu a znalosti rozsahu kožního vstřebávání, odvozené z předchozích testů kožní toxicity.

##### *Orální studie*

Tam, kde se testovaná látka vstřebává z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud nejsou proti tomu nějaké důvody. Zvířata mohou dostat testovanou látku v potravě, rozpuštěnu v pitné vodě nebo podanou v tobolce.

Ideálně by se měla látka podávat sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k vymizení toxicity nebo naopak vyvolat "abstinenční" příznaky v období bez aplikace, a tudíž ovlivnit výsledky a následné hodnocení. Nicméně, především s ohledem na praktické aspekty, dávkování pětkrát týdně je považováno za přijatelné.

##### *Inhalační studie*

Protože inhalační studie jsou technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o této cestě podání. Intratracheální instilace může být platnou alternativou v specifických situacích.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané lidské expozice, takže zvíře je obvykle exponováno po ustálení koncentrace šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo v návaznosti na možnou expozici v prostředí, 22-24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou pro krmení zvířat denně ve stejnou dobu dne, použitou i pro čištění expozičního boxu. V obou případech jsou zvířata obvykle exponována fixním koncentracím testované látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a stálou expozicí je v tom, že v první má zvíře 17-18 hodin na ústup účinků denní expozice s ještě delším obdobím během víkendu.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studia a na lidské expozici, která má být simulována. Nicméně, je třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Na příklad, výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek zevního prostředí mohou být narušeny nutností pití a krmení během expozice a potřebou komplikovanější (a spolehlivější) generace aerosolu nebo určité koncentrace par a technik monitorování.

### *Expoziční komory*

Zvířata se exponují v inhalačních komorách jejichž konstrukce zaručuje dynamický proud pro nejméně 12 výměn vzduchu za hodinu, aby byl zajištěn dostatečný přísun kyslíku a rovnoměrná distribuce expoziční atmosféry. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, tak aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech aspektech vyjma expozice testované látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak a tím se brání úniku testované látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat shlukování testovaných zvířat. Obecně by v zájmu udržení stabilní atmosféry v komoře objem zvířat neměl přesáhnou 5 % objemu komory.

Měření nebo monitorování zahrnuje:

(a) průtok vzduchu: rychlost průtoku vzduchu komorou by měla být nejlépe kontrolována kontinuálně;

(b) koncentrace: během denní expozice by koncentrace testované látky neměla kolísat více než  $\pm 15\%$  střední hodnoty;

(c) teplota a vlhkost: pro hlodavce, teplota by měla být udržována v rozmezí  $22 \pm 2$  °C a vlhkost v komorách 30 - 70 % vyjma případů, kdy je voda používána k rozptýlení testované látky v atmosféře komory. Oba parametry by měly být kontrolovány průběžně;

(d) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly být v respirabilní velikosti pro použité testovací zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna často během vývoje generujícího systému, aby zajistila stabilitu aerosolu, a poté během expozic tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

#### *1.2.2.6 Trvání studie*

Expozice látky by měla trvat nejméně 12 měsíců.

#### *1.2.3 Popis postupu*

##### *1.2.3.1 Pozorování*

Pečlivé klinické sledování by mělo být prováděno nejméně jednou denně. Dodatečná pozorování by měla být prováděna denně s odpovídajícími zákroky k minimalizaci ztráty zvířat ze studie, např. pitva nebo uložení do lednice u zvířat, která jsou nalezena mrtvá a izolace nebo utracení zvířat, která jsou slabá nebo moribundní. Zvířata je třeba pečlivě sledovat, aby se spolehlivě zachytil začátek a progresse všech toxických účinků, a také za účelem minimalizace ztrát v důsledku nemoci, autolýzy nebo kanibalismu.

Registrují se klinické příznaky včetně neurologických a očních změn u všech zvířat, a dále případy uhynutí. Zaznamenává se doba objevení a postup toxických příznaků včetně podezření na tumor.



Hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období testu a aspoň jednou za čtyři týdny po tomto období. Je třeba provádět měření spotřeby potravy (a vody tam, kde je testovaná látka podávána v pitné vodě) týdně během prvních 13 týdnů a pak přibližně ve tříměsíčních intervalech, ledaže by zdravotní stav nebo změny tělesné váhy ukázaly nutnost jiné frekvence sledování.

### 1.2.3.2 Hematologická vyšetření

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček, nebo jiné ukazatele srážlivosti) by měla být prováděna za tři měsíce, šest měsíců a poté v přibližně šestiměsíčních intervalech, a na konci na vzorcích krve shromážděných od všech nehlodavců resp. od 10 potkanů na pohlaví z každé skupiny. Tam kde je to možné, vzorky ve všech intervalech by měly být od stejných potkanů. Navíc by měl být odebrán vzorek před testem od nehlodavců.

Pokud klinické vyšetření zvířat naznačí zhoršený zdravotní stav zvířat během studie, měl by být stanoven diferenciální obraz bílých krvinek.

Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetří ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrol. Pokud tato data, nebo údaje z vyšetření patologických změn naznačí nutnost, vyšetří se i u skupiny s dávkou nejbližší nižší.

### 1.2.3.3 Analýza moči

Vzorky moči 10 potkanů každého pohlaví se sbírají pro analýzu pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologické zkoušky. Následující stanovení jsou provedena buď na vzorcích jednotlivých zvířat nebo na smíšeném vzorku pro skupiny podle dávek a pohlaví:

- vzhled moči, objem a hustota u jednotlivých zvířat,
- proteiny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semi-kvantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semi-kvantitativně).

### 1.2.3.4 Biochemické vyšetření

V přibližně šestiměsíčních intervalech a na závěr jsou odebrány krevní vzorky pro biochemická měření od všech nehlodavců a 10 potkanů obojího pohlaví v každé skupině, pokud možno pro tytéž potkany ve všech intervalech. Od nehlodavců se vedle toho odeberou vzorky před testem. Z těchto vzorků je připravena plasma a jsou provedeny následující zkoušky :

- celková koncentrace proteinů,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita bázičké fosfatázy, aktivita glutamát pyruvát transaminasy<sup>1</sup>, glutamát acetát transaminasy<sup>2</sup>), gamma glutamyl transpeptidasy, ornithin dekarboxylasy,
- metabolismus glycidů, např. krevní glukosa na lačno,

<sup>1</sup> nyní známá jako sérová alanin aminotransferasa

<sup>2</sup> nyní známá jako sérová aspartát aminotransferasa

-testy na funkci ledvin, např. dusík močoviny v krvi.

#### 1.2.3.5 Pitva

Kompletní pitva se provede u všech zvířat, včetně těch, která zemřela během pokusu nebo byla utracena v moribundním stavu. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné tumory nebo léze, nebo léze, které by mohly být tumory, je třeba uchovat. Mělo by být provedeno porovnání anatomicko-patologických změn s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně by měly být uchovány pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozku<sup>3</sup> (prodloužené míchy/mostu, mozečkové kory, kory mozkové), podvěsku mozkového, štítné žlázy a příštítných tělísek, thymu, trachey a plic, srdce, aorty, slinných žlaz, jater<sup>3</sup>, sleziny, ledvin<sup>3</sup>, nadledvinek<sup>3</sup>, jícnu, žaludku, dvanácterníku, jejunu, ilea, slepého střeva, tračníku, konečníku, močového měchýře, lymfatických uzlin, slinivky, gonád<sup>3</sup>, akcesorních pohlavních orgánů, samičí mléčné žlázy, kůže, svaloviny, periferního nervu, míchy (krční, hrudní a bederní), sterna s kostní dřeví a stehenní kosti včetně kloubů, a očí. Naplnění plic a močového měchýře fixativem je optimální cestou ke konzervaci těchto tkání; naplnění plic v inhalačních studiích, je zásadní pro odpovídající histopatologické zkoumání. Ve speciálních studiích jako jsou inhalační studie, má být studován celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, informace získané z těchto procedur by měly být k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou dát patologovi významné vodítko.

#### 1.2.3.6 Histopatologie

Všechny viditelné změny, zvláště tumory a jiné léze vyskytující se v kterémkoli orgánu, mají být zkoumány mikroskopicky. Navíc jsou doporučeny následující postupy:

(a) mikroskopické vyšetření všech uchovaných orgánů a tkání s kompletním popisem všech lézí nalezených:

1. u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie,
2. u všech zvířat ze skupiny s vysokou dávkou a kontrolní skupiny

(b) orgány či tkáně ukazující abnormality způsobené nebo pravděpodobně způsobené testovanou látkou jsou zkoumány také ve skupinách s nižšími dávkami,

(c) tam, kde výsledky svědčí pro významné zkrácení normální délky života zvířat nebo vyvolání účinků, které by mohly ovlivnit toxickou odpověď, skupina s nejbližší nižší dávkou se vyšetří popsáním způsobem,

(d) informace o incidenci lézí, které se normálně vyskytují v použitém kmeni zvířat, ve stejných laboratorních podmínkách, t.j. historické kontrolní údaje, jsou nezbytné pro správné posouzení významnosti změn pozorovaných u zvířat s aplikovanou látkou.

---

<sup>3</sup> tyto orgány z 10 zvířat na pohlaví a na skupinu u hlodavců a ze všech nehlodavců, a dále štítná žláza (s příštítnými tělísky) ze všech nehlodavců, mají být zváženy

## 2. ÚDAJE

Údaje by měly být sumarizovány ve formě tabulek, ukazujících pro každou testovanou skupinu počet zvířat na začátku testu, počet zvířat vykazujících léze a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky by měly být vyhodnoceny odpovídající statistickou metodou. Mohou být použity jakékoliv uznávané statistické metody.

## 3. ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o testu

Zpráva o testu bude, pokud možno, obsahovat následující informace:

- živočišný druh, kmen, zdroj, podmínky ustájení, dieta,
- podmínky testu: popis expozičního zařízení včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému pro vytváření částic a aerosolů, metody klimatizace, zneškodňování vzduchu vycházejícího z aparatury a způsobu umístění zvířat v expozičním boxu, pokud se používá. Dále je třeba popsat zařízení pro měření teploty, vlhkosti, a tam, kde je to žádoucí, stability koncentrace nebo velikosti částic aerosolu. Údaje o expozici: ve formě tabulky včetně průměrných hodnot a variability (např. standardní odchylka) a měly by zahrnovat:
  - (a) rychlost průtoku vzduchu inhalačním zařízením
  - (b) teplotu a vlhkost vzduchu
  - (c) nominální koncentrace (celkové množství testované látky vstupující do inhalační aparatury děleno objemem vzduchu)
  - (d) povahu vehikula, je-li použito
  - (e) skutečné koncentrace v dýchací zóně
  - (f) mediány velikosti částic (je-li to relevantní)
- dávkové úrovně (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace
- údaje o toxické odpovědi podle pohlaví a dávky
- neúčinná (dávková) úroveň
- doba úmrtí během studie nebo zda zvířata přežila až do konce
- popis toxických a jiných účinků
- doba, kdy byl pozorován každý abnormální příznak a jeho další vývoj
- data o spotřebě potravy a tělesné hmotnosti
- oftalmologické nálezy
- použité hematologické testy a výsledky
- testy klinické biochemie a všechny výsledky (včetně výsledků analýzy moči)
- pitevní nálezy
- detailní popis všech histopatologických nálezů
- statistické zpracování výsledků s popisem použitých metod
- diskuse výsledků
- interpretace výsledků.

## **B.31 STUDIE TERATOGENITY – HLODAVCI A NEHLODAVCI**

### **1. METODIKA**

#### **1.1 Princip testovací metody**

Testovaná látka se podává v odstupňovaných dávkách nebo koncentracích několika skupinám březích pokusných zvířat, jedna dávka na každou skupinu, alespoň v tom období březosti, ve kterém dochází k organogenezi. Krátce před očekávaným datem porodu jsou březí samice utráceny a jejich děloha i s obsahem je použita k dalšímu studiu. Tato testovací metoda zahrnuje studium embryo- a fetotoxicity.

#### **1.2 Popis testovací metody**

##### **1.2.1 Příprava**

Mladé, dospělé samice, které nikdy nebyly březí, stejného věku a velikosti jsou aklimatizovány při laboratorních podmínkách aspoň 5 dní před započítáním testu. Potom jsou připuštěni samci s ověřenou plodností. Oplozené samice jsou náhodně rozděleny do experimentálních skupin.

Oplození může být zajištěno přirozenou cestou nebo umělou inseminací. Testovaná látka je podávána samicím denně. Aplikace začíná časně po implantaci a pokračuje během období organogeneze. Den před termínem jsou plody vyjmuty hysterektomií a podrobeny sledování abnormalit skeletu a vnitřních orgánů včetně sledování možnosti zpomaleného růstu, opožděné osifikace a krvácení do střeva.

##### **1.2.2 Testovací podmínky**

###### **1.2.2.1 Experimentální zvířata**

Běžně používanými druhy jsou potkan, myš, křeček a králík. Preferovanými druhy jsou potkan a králík. Je třeba používat všeobecně zavedené kmeny. Používaný kmen by neměl mít nízkou plodnost a měly by být u něj známy reakce na teratogeny. Zvířata jsou chována jednotlivě.

###### **1.2.2.2 Počet a pohlaví**

Pro každou dávku je třeba použít aspoň 20 březích potkanů, myší nebo křečků nebo 12 březích králíků. Ke sledování teratogenního potenciálu studované látky je třeba zajistit dostatečný počet vrhů a mlád'at.

###### **1.2.2.3 Dávky**

Je třeba použít aspoň tři dávky a jednu kontrolní skupinu. V případě, že je testovaná látka podána ve vehikulu, je třeba zahrnout do studie i skupinu, které bylo podáno samotné vehikulum. Je třeba také znát toxikologické vlastnosti vehikula: nesmí být teratogenní ani mít vliv na reprodukční schopnosti. Se zvířaty v kontrolní(ch) skupině(ách) se zachází stejným způsobem jako se zvířaty v testovací skupině s výjimkou aplikace testované látky. Pokud to fyzikálně chemické nebo biologické

vlastnosti dovolují, pak nejvyšší dávka testované látky by v ideálním případě měla u matek vyvolat takové projevy toxicity, jako je mírné snížení váhy, ale už ne více jak 10 % úmrtí. Nízká úroveň dávek by neměla vyvolat viditelné účinky. Střední dávky by měly být voleny tak, aby byly geometricky rozloženy mezi nízkou a vysokou dávkou.

#### 1.2.2.4 *Limitní test*

V případě, že látka s nízkou toxicitou při dávce nejméně 1000 mg.kg<sup>-1</sup> prokazatelně nevyvolá projevy embryotoxicity ani teratogenicity, není třeba testovat na jiných úrovních dávek.

#### 1.2.2.5 *Doba exposice*

Nultým dnem testu je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie (pokud možno). Doba aplikace by měla zahrnovat období hlavní organogeneze. Za toto období je možno považovat 6. až 15. den u potkana a myši, 6. až 14. den u křečka a 6. až 18. den u králíka. V případě, že je za nultý den považován den, kdy bylo pozorováno páření nebo byla provedena umělá inseminace, je třeba připočítat k předchozím údajům jeden den. Podle jiné alternativy končí aplikace jeden den před očekávaným porodem.

#### 1.2.2.6 *Období pozorování*

Každý den je třeba provést pečlivé klinické vyšetření. Další sledování a opatření jsou prováděna za účelem minimalizace ztrát během studie.

### 1.2.3 Popis postupu

Testovaná látka je aplikována orálně sondou, denně ve stejnou dobu.

Testovaným samicím se testovaná látka podává denně během příslušného období testu. Dávka může být vztažena na váhu samic na počátku podávání látky nebo, vzhledem k rychlému nárůstu hmotnosti během březosti, zvířata mohou být periodicky vážena a dávka upravována podle posledního vážení. Všechny známky toxicity je třeba ihned zaznamenat včetně doby nástupu, stupně a trvání. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného porodu je třeba utratit a řádně makroskopicky vyšetřit. V pozorování je třeba pokračovat i po ukončení podávání látky až do doby přibližně jeden den před porodem. Hlavním účelem je postihnout většinu období březosti, ale vyhnout se komplikacím při interpretaci výsledků po přirozeném porodu. Pozorování zvířat v kleci by mělo zahrnovat přinejmenším změny kůže a srsti, očí a sliznic, dále dýchacího, oběhového, autonomního a centrálního nervového systému, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden je třeba měřit spotřebu potravy a vážit zvířata.

#### 1.2.3.1 *Pitva*

Pokud dojde k uhynutí během nebo na konci studie je třeba u samic makroskopicky vyšetřit na morfologické abnormality nebo patologické změny, které mohly mít vliv na průběh březosti. Ihned po smrti je třeba odstranit dělohu a její obsah vyšetřit s ohledem na úmrtí embryí a zárodků a zjistit počet živých zárodků. Obvykle je možné určit dobu úmrtí zárodků v děloze. U potkanů a králíků je možné stanovit počet žlutých tělísek. Je třeba určit pohlaví zárodků a zaznamenat váhu jednotlivých

zárodků a vypočítat průměr. Po vyjmutí je třeba jednotlivě zevně vyšetřit každý zárodek. U potkanů, myši a křečků je třeba vyšetřit kosterní abnormality u zhruba jedné třetiny až poloviny vrhu a u zbytku vhodnými metodami vyšetřit abnormality měkkých tkání. U králíků je třeba každý zárodek důkladně vyšetřit pitvou z hlediska abnormalit vnitřností a skeletu.

## 2. ÚDAJE

Údaje je třeba shrnout ve formě tabulky, udávající pro každou testovanou skupinu počet zvířat na začátku testu, počet zvířat, která zabřezla, počet a procento živých zárodků a zárodků s abnormalitami skeletu nebo měkkých tkání a vztah výskytu abnormalit k příslušnosti k určitým vrhům. Výsledky se hodnotí vhodnou statistickou metodou. Je možno použít jakékoliv uznávané statistické metody.

## 3. ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o testu.

Zpráva o testu by měla pokud možno obsahovat následující informace:

- druh, kmen, zdroj, podmínky ustájení, potrava,
- podmínky testu,
- dávky (včetně vehikula pokud bylo použito) a koncentrace,
- projevy toxicity pro každou dávku,
- dávka bez účinku (pokud ji bylo možno stanovit),
- dobu úmrtí během studie nebo zda zvířata přežila do konce testu,
- údaje o tělesné hmotnosti a spotřebě potravy,
- délka březosti a údaje o vrhu (včetně historických údajů),
- údaje o zárodcích (živé/mrtvé, pohlaví, defekty skeletu a měkkých tkání),
- údaje o jednotlivých vrzích (živé/mrtvé plody, pohlaví, defekty skeletu a měkkých tkání),
- statistické vyhodnocení výsledků,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## B.32 TEST KARCINOGENITY

### 1. METODA

#### 1.1 Princip metody

Testovaná látka je podávána obvykle sedm dní v týdnu, vhodnou cestou, několika skupinám pokusných zvířat, jedna dávka na skupinu, po větší část života zvířat. Během a po expozici testované látce jsou zvířata denně pozorována za účelem sledování projevu toxicity, zvláště vývinu tumorů.

#### 1.2 Popis metody

Zvířata se chovají v pokusných podmínkách ustájení a krmení nejméně pět dní před započítáním testu. Před testem se mladá zdravá zvířata náhodně rozdělí do kontrolních a exponovaných skupin.

##### 1.2.1 Experimentální zvířata

Preferovaným druhem je potkan. Na základě předchozích studií je možno použít i další druhy (hlodavce i nehlodavce). Používají se zdravá mladá zvířata z běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat. Expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mlád'at. Na začátku studie by neměl rozdíl ve váze zvířat činit více než  $\pm 20\%$  od průměru. V případě, že vlastní studii předchází test subchronické orální toxicity, je třeba použít stejný druh a kmen v obou studiích.

##### 1.2.2 Počet a pohlaví

Pro hlodavce se užije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávky a souběžná kontrolní skupina. Samice by měly být nullipary a negravidní. Je-li plánováno průběžné utrácení zvířat, počty je třeba zvýšit o počet zvířat, která budou takto utracena před koncem studie.

##### 1.2.3 Dávkové úrovně a frekvence expozic.

Zvolí se při nejmenším tři dávkové úrovně kromě souběžné kontrolní skupiny. Nejvyšší dávková úroveň by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10%), bez podstatnějších změn normální doby dožití daných jinými účinky než tumory.

Nejnižší dávková úroveň by neměla interferovat s normálním růstem, vývojem a délkou života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10% vysoké dávky. Střední dávku/dávky je třeba stanovit ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Volba dávkových úrovní by měla vzít v úvahu předchozí testy a studie toxicity.

Expozice se provádí obvykle denně. Je-li látka podávána v pitné vodě nebo přimíšena do potravy, měla by být stále k dispozici.

##### 1.2.4 Kontroly

Souběžná kontrolní skupina je identická v každém ohledu s exponovanou skupinou, vyjma expozice testované látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly nebo použije-li se pro orální aplikaci emulgátoru, jehož biologická aktivita není charakterizována, zařadí se další negativní kontrolní skupina, která není exponována ani vehikulu.

#### 1.2.5 Způsob aplikace

Tři hlavní cesty aplikace jsou orální, dermální a inhalační. Volba způsobu podání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách testované látky a pravděpodobném způsobu expozice u člověka.

##### 1.2.5.1 Orální studie

Tam, kde se testovaná látka vstřebává z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud nejsou proti tomu nějaké důvody. Zvířata mohou dostat testovanou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podanou v tobolce.

Ideálně by se měla látka podávat sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k vymizení toxicity nebo naopak vyvolat "abstinenční" příznaky v období bez aplikace, a tudíž ovlivnit výsledky a následné hodnocení. Nicméně, především s ohledem na praktické aspekty, dávkování pětkrát týdně je považováno za přijatelné.

##### 1.2.5.2 Dermální studie

Aplikace přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty vstupu u člověka a jako modelový způsob vyvolání kožního poškození.

##### 1.2.5.3 Inhalační studie

Protože inhalační studie jsou technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o této cestě podání. Intratracheální instilace může být platnou alternativou v specifických situacích.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané lidské expozice, takže zvíře je obvykle exponováno po ustálení koncentrace šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo v návaznosti na možnou expozici v prostředí, 22-24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou pro krmení zvířat denně ve stejnou dobu dne, použitou i pro čištění expozičního boxu. V obou případech jsou zvířata obvykle exponována fixním koncentracím testované látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a stálou expozicí je v tom, že v první má zvíře 17-18 hodin na ústup účinků denní expozice s ještě delším obdobím během víkendu.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studia a na lidské expozici, která má být simulována. Nicméně, je třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Na příklad, výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek zevního prostředí mohou být narušeny nutností pití a krmení během expozice a potřebou komplikovanější (a spolehlivější) generace aerosolu nebo určité koncentrace par a technik monitorování.

Expoziční komory



Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamický proud pro nejméně 12 výměn vzduchu za hodinu, aby byl zajištěn dostatečný přísun kyslíku a rovnoměrná distribuce expoziční atmosféry. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, tak aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech aspektech vyjma expozice testované látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak a tím se brání úniku testované látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat shlukování testovaných zvířat. Obecně by v zájmu udržení stabilní atmosféry v komoře objem zvířat neměl přesáhnout 5% objemu komory.

Měření nebo monitorování zahrnuje:

(a) Průtok vzduchu: rychlost průtoku vzduchu komorou by měla být nejlépe kontrolována kontinuálně;

(b) Koncentrace: během denní expozice by koncentrace testované látky neměla kolísat více než  $\pm 15\%$  střední hodnoty.

(c) Teplota a vlhkost: pro hlodavce, teplota by měla být udržována v rozmezí  $22 \pm 2$  °C a vlhkost v komorách 30 - 70 % vyjma případů, kdy je voda používána k rozptýlení testované látky v atmosféře komory. Oba parametry by měly být kontrolovány průběžně.

(d) Měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly být v respirabilní velikosti pro použité testovací zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna často během vývoje generujícího systému, aby zajistila stabilitu aerosolu, a poté během expozic tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

#### 1.2.6 Trvání studie

Trvání testu karcinogenity zahrnuje větší část normální doby života zvířate použitého pro test. Test by měl být ukončen v 18 měsících u myši a křečků a 24 měsících u potkanů. Nicméně, pro některé kmeny zvířat s delší dobou života resp. s nízkým spontánním výskytem tumorů, doba ukončení by měla být 24 měsíců pro myši a křečky a 30 měsíců pro potkany. Alternativně, ukončení takové prodloužené studie je přijatelné, když počet přežívajících u nejnižší dávky nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení testu, ve kterém je zřetelný sexuální rozdíl odpovědi, každé pohlaví se posuzuje zvlášť. Tam, kde uhynie předčasně jen skupina s vysokou dávkou ze zjevných toxických příčin, nemusí to nutně vést k ukončení celého testu, pokud ostatní skupiny nevykazují toxické projevy, které by činily problémy. Aby bylo možno uznat negativní výsledek testu, nesmí být ztráty použitelných údajů (autolýzou, kanibalismem nebo v důsledku chyb obsluhy) v žádné skupině větší než 10% a přežití ve všech skupinách nesmí být nižší než 50% v 18 měsících u myši a křečků a v 24 měsících u potkanů.

### 1.3 Popis postupu

#### 1.3.1 Pozorování

Denní pozorování zvířat v klecích zahrnuje změny kůže a srsti, očí a sliznic, jakož i dýchacího, oběhového, autonomního a centrálního nervového systému, somatomotorické aktivity a chování.

Pravidelná kontrola zvířat je nutná, aby se zabránilo ztrátám zvířat ze studie v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chyb v obsluze. Moribundní zvířata jsou utracena a pitvána.

Klinické příznaky a mortalita by měly být zaznamenány u všech zvířat. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného či hmatného tumoru se zaznamenává.

Je třeba provádět měření spotřeby potravy (a vody tam, kde je testovaná látka podávána v pitné vodě) týdně během prvních 13 týdnů a pak přibližně ve tříměsíčních intervalech, ledaže by zdravotní stav nebo změny tělesné váhy ukázaly nutnost jiné frekvence sledování.

Tělesné hmotnosti se zaznamenávají individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období testu a aspoň jednou za čtyři týdny po tomto období.

#### 1.3.2 Klinická vyšetření

##### 1.3.2.1 Hematologie

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studia, je třeba vyšetřit diferenciální obraz bílých krvinek.

Za 12 měsíců, za 18 měsíců a před utracením zvířat se provede krevní nátěr ze všech zvířat. Diferenciál bílých krvinek se provede ve vzorcích ze zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrol. Pokud tato data, zvláště údaje získané před utracením, nebo údaje z vyšetření patologických změn naznačí nutnost, diferenciál se vyšetří i u skupiny s dávkou nejbližší nižší, než je vysoká dávka.

##### 1.3.2.2 Pitva

Kompletní pitva by měla být provedena u všech zvířat, včetně těch, která zemřela během pokusu nebo byla utracena, protože byla nemocná. Všechny viditelné tumory nebo léze, nebo léze které by mohly být tumory, je třeba uchovat.

Následující orgány a tkáně by měly být uchovány ve vhodných médiích pro možné budoucí histopatologické vyšetření: mozek (včetně řezů prodloužené míchy/mostu, mozečkové kory, kory mozkové), podvěsek mozkový, štítná žláza a příštítná tělíska, tkáň thymu, trachea a plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, pankreas, gonády, děloha, akcesorní pohlavní orgány, kůže, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, slepé střevo, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatická uzlina, samičí mléčná žláza, svalovina stehna, periferní nerv, sternum s kostní dřeví, stehenní kost včetně kloubu, mícha na třech úrovních (krční, střední hrudní a bederní) a oči.

Naplnění plic a močového měchýře fixativem je optimální způsob uchování těchto tkání. Naplnění plic v inhalačních studiích je zásadní pro odpovídající

histopatologické vyšetření. V inhalačních studiích by měl být uchován celý respirační trakt včetně nosní dutiny, hltanu a hrtanu.

### 1.3.2.3 *Histopatologické vyšetření*

- (a) Úplná histopatologie se provede v orgánech a tkáních všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během testu a u všech zvířat skupiny kontrolní a s nejvyšší dávkou..
- (b) Všechny tumory viditelné okem a léze, které jsou podezřelé jako tumory, se vyšetří mikroskopicky u všech skupin.
- (c) Je-li významný rozdíl v incidenci neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, histopatologické vyšetření se provede v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách.
- (d) Je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrol, měla by být kompletně zkoumána i skupina s nejbližší nižší dávkou.
- (e) Je-li ve skupině s vysokou dávkou doklad o vyvolání toxických nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou odpověď, je třeba kompletně vyšetřit nejbližší nižší dávkovou úroveň.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sumarizují ve formě tabulek, ukazujících pro každou testovanou skupinu počet zvířat na začátku testu, počet zvířat vykazujících tumory zjištěné během testu, doba jejich stanovení a počet zvířat s tumory při utracení. Výsledky se hodnotí odpovídající statistickou metodou. Mohou být použity jakékoliv uznávané statistické metody.

## 3. ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o testu

Zpráva o testu bude, pokud možno, obsahovat následující informace:

- živočišný druh, kmen, zdroj, podmínky ustájení, dieta,
- podmínky testu:

Popis expozičního zařízení: včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému pro vytváření částic a aerosolů, metody klimatizace, zneškodňování vzduchu vycházejícího z aparatury a způsobu umístění zvířat v expozičním boxu, pokud se používá. Dále je třeba popsat zařízení pro měření teploty, vlhkosti, a tam, kde je to žádoucí, stability koncentrace nebo velikosti částic aerosolu. Údaje o expozici: ve formě tabulky včetně průměrných hodnot a variability (např. směrodatná odchylka) a měly by zahrnovat:

- (a) rychlost průtoku vzduchu v inhalačním zařízení,
- (b) teplotu a vlhkost vzduchu,
- (c) nominální koncentraci (celkové množství testované látky vstupující do inhalační aparatury děleno objemem vzduchu),
- (d) povahu vehikula, je-li použito,

- (e) skutečné koncentrace v dýchací zóně,
- (f) medián velikosti částic (tam kde je relevantní),
  - dávkové úrovně (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
  - incidence tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
  - doba úmrtí během studie nebo zda zvířata přežila až do konce,
  - výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky,
  - popis toxických a jiných účinků,
  - doba, kdy byl pozorován jakýkoliv abnormální příznak a jeho další vývoj,
  - data o spotřebě potravy a tělesné hmotnosti,
  - použité hematologické testy a výsledky,
  - nálezy patologicko-anatomické,
  - detailní popis všech histopatologických nálezů,
  - statistické zpracování výsledků s popisem použitých metod,
  - diskuse výsledků,
  - interpretace výsledků.

## **B.33 KOMBINOVANÝ TEST CHRONICKÉ TOXICITY/ /KARCINOGENITY**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testu

Cílem kombinovaného testu chronické toxicity/karcinogenity je určit chronické a karcinogenní účinky látky u některého druhu savců po dlouhodobé expozici.

Pro tento účel je test karcinogenity doplněn alespoň jednou exponovanou satelitní skupinou a kontrolní satelitní skupinou. Dávka použitá pro tuto satelitní skupinu může být vyšší než nejvyšší dávka použitá při testu karcinogenity. Zvířata v testu karcinogenity jsou zkoumána jak na obecnou toxicitu, tak na karcinogenní odpověď. Zvířata v exponované satelitní skupině jsou testována na obecnou toxicitu.

Testovaná látka se podává obvykle sedm dní v týdnu, vhodnou cestou, několika skupinám pokusných zvířat, jedna dávka na skupinu, po větší část života zvířat. Během a po expozici testované látky jsou zvířata denně pozorována za účelem sledování projevů toxicity a vývoje tumorů.

#### 1.2 Popis metody

Zvířata se chovají v pokusných podmínkách ustájení a krmení nejméně pět dní před započítáním testu. Před testem se mladá zdravá zvířata náhodně rozdělí do kontrolních a exponovaných skupin.

##### 1.2.1 Experimentální zvířata

Preferovaným druhem je potkan. Na základě předchozích studií je možno použít i další druhy (hlodavce i nehlodavce). Používají se zdravá mladá zvířata z běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat. Expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mlád'at. Na začátku studie by neměl rozdíl ve váze zvířat činit více než  $\pm 20\%$  od průměru. V případě, že vlastní studii předchází test subchronické orální toxicity, je třeba použít stejný druh a kmen v obou studiích.

##### 1.2.2 Počet a pohlaví

Pro hlodavce se použije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) na každou úroveň dávky a souběžná kontrolní skupina. Samice by měly být nullipary a negravidní. Je-li plánováno průběžné utrácení zvířat, počty se zvýší o počet zvířat, která budou takto utracena před koncem studie.

Exponovaná satelitní skupina (skupiny) pro hodnocení patologie jiné než jsou tumory by každá měla obsahovat 20 zvířat pro každé pohlaví, zatímco satelitní skupina kontrol by měla obsahovat 10 zvířat každého pohlaví.

### 1.2.3 Dávkové úrovně a frekvence exposic.

Pro test karcinogenity se zvolí přinejmenším tři dávkové úrovně kromě souběžné kontrolní skupiny. Nejvyšší dávková úroveň by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10%), bez podstatnějších změn normální doby dožití daných jinými účinky než tumory. Nejnižší dávková úroveň by neměla interferovat s normálním růstem, vývojem a délkou života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10% vysoké dávky. Střední dávku/dávky je třeba stanovit ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Při volbě dávkových úrovní by se měly vzít v úvahu předchozí testy a studie toxicity.

Pro účely testování chronické toxicity jsou v testu zahrnuty satelitní exponované skupiny a souběžná kontrolní satelitní skupina. Vysoká dávka pro exponovaná satelitní zvířata by měla vyvolat zřetelné příznaky toxicity.

Exposice se provádí obvykle denně. Je-li látka podávána v pitné vodě nebo přimíšena do potravy, měla by být stále k dispozici.

### 1.2.4 Kontroly

Souběžná kontrolní skupina je identická v každém ohledu s exponovanou skupinou, vyjma expozice testované látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly nebo použije-li se pro orální aplikaci emulgátoru, jehož biologická aktivita není charakterizována, zařadí se další negativní kontrolní skupina, která není exponována ani vehikulu.

### 1.2.5 Způsob aplikace

Tři hlavní cesty aplikace jsou orální, dermální a inhalační. Volba způsobu podání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách testované látky a pravděpodobnému způsobu expozice u člověka.

#### 1.2.5.1 Orální studie

Tam, kde se testovaná látka vstřebává z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud nejsou proti tomu nějaké důvody. Zvířata mohou dostat testovanou látku v potravě, rozpuštěnu v pitné vodě nebo podanou v tobolce.

Ideálně by se měla látka podávat sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dní v týdnu může vést k vymizení toxicity nebo naopak vyvolat "abstinenční" příznaky v období bez aplikace, a tudíž ovlivnit výsledky a následné hodnocení. Nicméně, především s ohledem na praktické aspekty, dávkování pětkrát týdně je považováno za přijatelné.

#### 1.2.5.2 Dermální studie

Aplikace přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty vstupu u člověka a jako modelový způsob vyvolání kožního poškození.

### 1.2.5.3 *Inhalační studie*

Protože inhalační studie jsou technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o této cestě podání. Intratracheální infúze může být platnou alternativou v specifických situacích.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané lidské expozice, takže zvíře je obvykle exponováno po ustálení koncentrace šest hodin denně po pět dní v týdnu (přerušovaná expozice), nebo v návaznosti na možnou expozici v prostředí, 22-24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou pro krmení zvířat denně ve stejnou dobu dne, použitou i pro čištění expozičního boxu. V obou případech jsou zvířata obvykle exponována fixním koncentracím testované látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a stálou expozicí je v tom, že v první má zvíře 17-18 hodin na ústup účinků denní expozice s ještě delším obdobím během víkendu.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na lidské expozici, která má být simulována. Nicméně, je třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Na příklad, výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek zevního prostředí mohou být narušeny nutností pití a krmení během expozice a potřebou komplikovanější (a spolehlivější) generace aerosolu nebo určité koncentrace par a technik monitorování.

#### Expoziční komory

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamický proud pro nejméně 12 výměn vzduchu za hodinu, aby byl zajištěn dostatečný přísun kyslíku a rovnoměrná distribuce expoziční atmosféry. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, tak aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech aspektech vyjma expozice testované látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak a tím se brání úniku testované látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat shlukování testovaných zvířat. Obecně by v zájmu udržení stabilní atmosféry v komoře objem zvířat neměl přesáhnout 5 % objemu komory.

Měření nebo monitorování zahrnuje:

(a) průtok vzduchu: rychlost průtoku vzduchu komorou by měla být nejlépe kontrolována kontinuálně,

(b) koncentrace: během denní expozice by koncentrace testované látky neměla kolísat více než  $\pm 15\%$  střední hodnoty,

(c) teplota a vlhkost: pro hlodavce, teplota by měla být udržována v rozmezí  $22 \pm 2$  °C a vlhkost v komorách 30 - 70 % vyjma případů, kdy je voda používána k rozptýlení testované látky v atmosféře komory. Oba parametry by měly být kontrolovány průběžně,

(d) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly být v respirabilní velikosti pro použité testovací zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna často během vývoje generujícího

systému, aby zajistila stabilitu aerosolu, a poté během exposic tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

#### 1.2.6 Trvání studie

Trvání *testu karcinogenity* zahrnuje větší část normální doby života zvířete použitého pro test. Test by měl být ukončen v 18 měsících u myši a křečků a 24 měsících u potkanů. Nicméně, pro některé kmeny zvířat s delší dobou života resp. s nízkým spontánním výskytem tumorů, doba ukončení by měla být 24 měsíců pro myši a křečky a 30 měsíců pro potkany. Alternativně, ukončení takové prodloužené studie je přijatelné, když počet přežívajících u nejnižší dávky nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení testu, ve kterém je zřetelný sexuální rozdíl odpovědi, každé pohlaví se posuzuje zvlášť. Tam, kde uhynie předčasně jen skupina s vysokou dávkou ze zjevných toxických příčin, nemusí to nutně vést k ukončení celého testu, pokud ostatní skupiny nevykazují toxické projevy, které by činily problémy. Aby bylo možno uznat negativní výsledek testu, nesmí být ztráty použitelných údajů (autolýzou, kanibalismem nebo v důsledku chyb obsluhy) v žádné skupině větší než 10% a přežití ve všech skupinách nesmí být nižší než 50% v 18 měsících u myši a křečků a v 24 měsících u potkanů.

Satelitní skupiny 20 dávkovaných zvířat pro každé pohlaví a 10 připojených kontrolních zvířat každého pohlaví použitých pro testování *chronické toxicity* by měly být v pokusu aspoň 12 měsíců. U těchto zvířat by mělo být plánováno utracení tak, aby umožnilo odlišení patologie, která má vztah k testované látce, od komplikujících projevů stárnutí.

### 1.3 Popis postupu

#### 1.3.1 Pozorování

Denní pozorování zvířat v klecích zahrnuje změny kůže a srsti, očí a sliznic, jakož i dýchacího, oběhového, autonomního a centrálního nervového systému, somatomotorické aktivity a chování.

U zvířat exponované satelitní skupiny (skupin) se provádí v přiměřených intervalech klinické vyšetření.

Pravidelná kontrola zvířat je nutná, aby se zabránilo ztrátám zvířat ze studie např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chyb v obsluze. Moribundní zvířata by měla být utracena a pitvána.

Klinické příznaky včetně neurologických a očních nálezů a mortalita se zaznamenávají u všech zvířat. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného či hmatného tumoru se zaznamenává.

Je třeba provádět měření spotřeby potravy (a vody tam, kde je testovaná látka podávána v pitné vodě) týdně během prvních 13 týdnů a pak přibližně ve tříměsíčních intervalech, ledaže by zdravotní stav nebo změny tělesné váhy ukázaly nutnost jiné frekvence sledování.

Tělesné hmotnosti se zaznamenávají individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období testu a aspoň jednou za čtyři týdny po tomto období.



### 1.3.2 Klinická vyšetření

#### 1.3.2.1 Hematologie

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček, nebo další měření srážlivosti) by měla být prováděna za tři měsíce, šest měsíců a poté v přibližně šestiměsíčních intervalech, a na konci na vzorcích krve od 10 potkanů na pohlaví z každé skupiny. Tam kde je to možné, vzorky ve všech intervalech by měly být od týchž potkanů.

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studia, je třeba vyšetřit diferenciální obraz bílých krvinek.

Diferenciální obraz bílých krvinek se provede ve vzorcích ze zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrol. Pokud tato data, nebo údaje z vyšetření patologických změn naznačí nutnost, diferenciál se vyšetří i u skupiny s dávkou nejbližší nižší, než je vysoká dávka.

#### 1.3.2.2 Analýza moči

Vzorky moči od 10 potkanů od každého pohlaví se sbírají pro analýzu pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologické zkoušky. Následující stanovení jsou provedena buď na vzorcích jednotlivých zvířat nebo na smíšeném vzorku pro skupiny podle dávek a pohlaví:

- vzhled moči, objem a hustota u jednotlivých zvířat,
- proteiny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semi-quantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semi-quantitativně).

#### 1.3.2.3 Biochemické vyšetření

V přibližně šestiměsíčních intervalech a na závěr jsou odebrány krevní vzorky pro biochemická měření od všech ne-hlodavců a 10 potkanů obojího pohlaví, pokud možno pro tytéž potkany ve všech intervalech. Od nehlodavců se vedle toho odeberou vzorky před testem. Z těchto vzorků je připravena plasma a jsou provedeny následující zkoušky :

- celková koncentrace proteinů,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita bázičké fosfatázy, aktivita glutamát pyruvát transaminasy<sup>1</sup>, glutamát acetát transaminasy<sup>2</sup>), gamma glutamyl transpeptidasy, ornithin dekarboxylasy,
- metabolismus cukrů, např. krevní glukosa na lačno,
- test na funkci ledvin, např. dusík močoviny v krvi.

---

<sup>1</sup> nyní známá jako sérová alanin aminotransferasa

<sup>2</sup> nyní známá jako sérová aspartát aminotransferasa

#### 1.3.2.4 Makroskopické patologické vyšetření

Kompletní pitva se provede u všech zvířat, včetně těch, která zemřela během pokusu nebo byla utracena v moribundním stavu. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné léze, tumory nebo léze, nebo léze které by mohly být tumory, je třeba uchovat. Mělo by být provedeno porovnání anatomicko-patologických změn s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně by měly být uchovány pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozku<sup>3</sup> (prodloužené míchy/mostu, mozečkové kory, kory mozkové), podvěsku mozkového, štítné žlázy a příštítných tělísek, thymu, trachey a plic, srdce, aorty, slinných žlaz, jater<sup>3</sup>, sleziny, ledvin<sup>3</sup>, nadledvinek<sup>3</sup>, jícnu, žaludku, dvanácterníku, jejunu, ilea, slepého střeva, tračníku, konečníku, močového měchýře, lymfatických uzlin, slinivky, gonád<sup>3</sup>, akcesorních pohlavních orgánů, samičí mléčné žlázy, kůže, svaloviny, periferního nervu, míchy (krční, hrudní a bederní), sterna s kostní dřeví a stehenní kosti včetně kloubů, a očí. Naplnění plic a močového měchýře fixativem je optimální cestou ke konzervaci těchto tkání; naplnění plic v inhalačních studiích je zásadní pro odpovídající histopatologické zkoumání. Ve speciálních studiích, jako jsou inhalační studie, má být studován celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, informace získané z těchto procedur by měly být k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou dát patologovi významné vodítko.

#### 1.3.2.5 Histopatologie

Pro testování chronické toxicity:

Podrobné vyšetření se provede ve všech uchovaných orgánech všech zvířat satelitní skupiny s vysokou dávkou a satelitní kontrolní skupiny. Pokud se v satelitní skupině exponované nejvyšší dávce najdou patologické změny způsobené látkou, vyšetří se histologicky cílové orgány všech ostatních zvířat z ostatních exponovaných satelitních skupin i ze všech exponovaných skupin části studie věnované karcinogenitě při jejím ukončení.

Pro testování karcinogenity:

(a) úplná histopatologie se provede v orgánech a tkáních všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během testu a u všech zvířat skupiny kontrolní a s nejvyšší dávkou;

(b) všechny tumory viditelné okem a léze, které jsou podezřelé jako tumory, se vyšetří mikroskopicky u všech skupin;

(c) je-li významný rozdíl v incidenci neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, histopatologické vyšetření se provede v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách;

(d) je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrol, měla by být kompletně zkoumána i skupina s nejbližší nižší dávkou;

---

<sup>3</sup> Tyto orgány z 10 zvířat na pohlaví a na skupinu hlodavců mají být zváženy.

(e) je-li ve skupině s vysokou dávkou doklad o vyvolání toxických nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou odpověď, je třeba kompletně vyšetřit nejbližší nižší dávkovou úroveň.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sumarizují ve formě tabulek, ukazujících pro každou testovanou skupinu počet zvířat na začátku testu, počet zvířat ukazujících tumory zjištěné během testu, dobu jejich stanovení a počet zvířat s tumory při utracení. Výsledky se hodnotí odpovídající statistickou metodou. Mohou být použity jakékoliv uznávané statistické metody.

## 3. ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o testu

Zpráva o testu bude, pokud možno, obsahovat následující informace:

- živočišný druh, kmen, zdroj, podmínky ustájení, dieta,
- podmínky testu: popis expozičního zařízení: včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému pro vytváření částic a aerosolů, metody klimatizace, zneškodňování vzduchu vycházejícího z aparatury a způsobu umístění zvířat v expozičním boxu pokud se používá. Dále je třeba popsat zařízení pro měření teploty, vlhkosti, a tam, kde je to žádoucí, stability koncentrace nebo velikosti částic aerosolu. Údaje o expozici: ve formě tabulky včetně průměrných hodnot a variability (např. směrodatná odchylka) by měly zahrnovat:
  - (a) rychlost proudu vzduchu v inhalačním zařízení,
  - (b) teplotu a vlhkost vzduchu,
  - (c) nominální koncentraci (celkové množství testované látky vstupující do inhalační aparatury děleno objemem vzduchu),
  - (d) povahu vehikula, je-li použito,
  - (e) skutečné koncentrace v dýchací zóně,
  - (f) medián velikosti částic (tam kde relevantní),
- dávkové úrovně (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
- data incidence tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
- doba úmrtí během studie nebo zda zvířata přežila až do konce, včetně satelitních skupin,
- výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky - popis toxických a jiných účinků,
- doba, kdy byl pozorován jakýkoliv abnormální příznak a jeho další vývoj,
- data o spotřebě potravy a tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- použité hematologické testy a výsledky,
- testy klinické biochemie a všechny výsledky (včetně výsledků analýzy moči),
- nálezy patologicko-anatomické,

- detailní popis všech histopatologických nálezů,
- statistické zpracování výsledků s popisem použitých metod,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.34 REPRODUKČNÍ TOXICITA - JEDNOGENERAČNÍ TEST**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává několika skupinám samic a samců v odstupňovaných dávkách.

Samci dostávají testovanou látku v době růstu a alespoň v průběhu jednoho úplného spermatogenního cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkanů), aby byl zachycen jakýkoliv nepříznivý účinek testované látky na spermatogenezu.

Samice rodičovské generace (P) dostávají látku po dobu alespoň dvou estrálních cyklů, aby byl zachycen jakýkoliv nepříznivý účinek testované látky na estrus. Zvířata jsou poté připuštěna. V době připouštění se testovaná látka podává zvířatům obou pohlaví, v době gravidity a kojení pouze samicím.

Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

#### 1.2 Popis testovací metody.

##### 1.2.1 Příprava

Před zahájením testu se zdravá mladá dospělá zvířata náhodně rozdělí do dvou skupin - kontrolní a exponované skupiny. Zvířata jsou chována nejméně 5 dnů před zahájením pokusu v těch podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu.

Doporučuje se testovanou látku podávat v potravě nebo v pitné vodě. Jiné způsoby podání jsou také přijatelné. Všechna zvířata látku dostávají stejným způsobem v průběhu celého testu. Pokud se používá k usnadnění aplikace vehikulum nebo jiné aditivum, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky. Látka se aplikuje 7 dní v týdnu.

##### 1.2.2 Pokusná zvířata

###### 1.2.2.1 Výběr druhu

Dává se přednost potkanům nebo myším. Používají se zdravá zvířata, do té doby nepoužitá pro jiné experimenty. Nepoužívá se kmenů s nízkou plodností. Musí být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví a váhy a/nebo věku. Plodnost musí být ověřena vhodným způsobem u obou pohlaví. Zvířata v obou skupinách, exponované a kontrolní, musí být odstavena před zahájením aplikace.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Každá exponovaná i kontrolní skupina musí mít dostatečný počet zvířat, aby bylo zaručeno cca 20 březích samic s přibližně stejným termínem porodu. Cílem je získat dostatečný počet těhotenství a potomstva, a tím zajistit spolehlivé hodnocení vlivu látky na plodnost, průběh gravidity a mateřské chování v P generaci, kojení, růst a vývoj potomstva generace F<sub>1</sub> od početí do odstavu.

### 1.2.3 Podmínky testu

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před porodem se těhotné samice přemístí do zvláštních porodních nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

### 1.2.4 Dávkování

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Pokud se používá pro aplikaci testované látky vehikulum, pak zvířata kontrolní skupiny dostávají vehikulum v nejvyšším použitém objemu. Pokud testovaná látka snižuje příjem a využití potravy, je třeba uvážit použití další kontrolní skupiny, spárované co do výživy.

Testovaná látka v nejvyšší koncentraci má v ideálním případě - pokud to není omezeno jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo povahou biologického účinku - vyvolávat toxicitu, ale žádná uhynutí v rodičovské populaci. Střední dávka(y) by měla(y) vyvolat minimální toxické účinky, které by se daly připsat testované látce, a nejnižší dávka by neměla vyvolávat žádné pozorovatelné nepříznivé účinky, ani u rodičů ani u potomstva.

Při podání sondou nebo v tobolkách se dávka stanoví individuálně na základě hmotnosti zvířete a přizpůsobuje se každý týden podle změny váhy. V případě těhotných samic dávky mohou být případně určeny na základě tělesné hmotnosti v 0. nebo 6.dni od začátku těhotenství.

### 1.2.5 Limitní test

V případě látek s nízkou toxicitou, pokud se ani dávka  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  neprojevuje žádným toxickým účinkem na reprodukci, nemusí se provádět studie na jiných dávkových úrovních. Pokud předběžná studie ukáže, že vysoká dávka, vyvolávající u matek jasné příznaky toxicity, nemá nepříznivé účinky na plodnost, není nutné provádět studie na jiných dávkových úrovních.

## 1.3 Popis postupu

### 1.3.1 Plán pokusu

Denní aplikace samcům rodičovské generace (P) začne ve věku pěti až devíti týdnů, po nejméně pětidenní aklimatizaci po odstavení. U potkanů aplikace pokračuje deset týdnů před obdobím připouštění (8 týdnů pro myši). Samci se buď utratí a vyšetří na konci období připouštění, nebo se pokračuje v aplikaci a mohou být použiti pro produkci dalších vrhů a jsou pak utraceni a vyšetřeni někdy před koncem pokusu.

Denní aplikace samicím rodičovské generace (P) začne po pětidenní aklimatizaci a pokračuje aspoň dva týdny před obdobím připouštění. Denní aplikace pokračuje pak po celé tři týdny období připouštění, v době gravidity až do odstavení  $F_1$  generace. Je přípustná změna dávkovacího plánu podle znalostí o vlastnostech studované látky, např. o indukci metabolismu a/nebo bioakumulaci.

### 1.3.2 Postup při připouštění

Je možno použít párování 1 : 1 (jedna samice a jeden samec) anebo 1:2 (jeden samec ke dvěma samicím).

V případě 1:1 párování, samice se ponechá s tímž samcem ve společné kleci do otěhotnění anebo po dobu 3 týdnů. Každé ráno jsou samice vyšetřeny na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 těhotenství je definován jako den nálezu vaginální zátky nebo spermatu.

Dvojice, u kterých nedojde k oplodnění, je třeba vyšetřit s cílem zjistit důvod neplodnosti páru. To je možné buď poskytnutím další příležitosti k oplodnění s osvědčenými jedinci obou pohlaví nebo mikroskopickým vyšetřením reprodukčních orgánů nebo vyšetřením estrálního cyklu a spermatogenezy.

### 1.3.3 Velikost vrhů

Zvířatům použitým pro vyšetření plodnosti je ponechána možnost porodit normálně a pečovat o své potomstvo do okamžiku odstavení bez standardizace velikosti vrhů. Pokud se velikost vrhů standardizuje, je třeba dodržet následující postup: mezi 1. a 4. dnem po porodu se velikost všech vrhů upraví vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby se dosáhlo počtu 4 samců a 4 samic na vrh; pokud to není proveditelné, je možno standardizovat na jiné počty, např. 5 samců a 3 samice. Vrhů menší než 8 nelze standardizovat.

### 1.3.4 Pozorování

Každé zvíře má být pozorováno alespoň jednou za den. Významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého porodu, a všechny příznaky toxicity, včetně mortality, se zaznamenávají. Příjem potravy se měří denně jak před tak během doby připouštění. Během gravidity je vhodné kontrolovat příjem potravy denně. Po porodu a v průběhu laktace se měří příjem potravy (a vody, pokud se látka podává v pitné vodě) ve stejný den, kdy je potomstvo váženo. Rodičovská P zvířata se váží první den aplikace a pak týdně. Všechna pozorování se zaznamenávají individuálně pro každé dospělé zvíře.

Doba gestace se počítá od dne 0 těhotenství. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mlád'at, počet mrtvých a živých porodů a přítomnost hrubých anomalií.

Mrtvá mlád'ata a mlád'ata utracená ve čtvrtém dnu se uchovávají pro vyšetření na možné defekty. Živá mlád'ata se spočítají a celé vrhy se zváží ráno po porodu, ve 4. a 7.dnu a potom každý týden do ukončení studie, kdy jsou zvířata zvážena individuálně. Pozorují se a zaznamenávají všechny abnormality v chování a fyzickém stavu matek a potomstva.

### 1.3.5 Patologie.

#### 1.3.5.1 Pitva

Po utracení nebo úmrtí se všechna zvířata generace P makroskopicky vyšetří na strukturní abnormality anebo patologické změny, se zvláštní pozorností k orgánům reprodukčního systému. Mlad'ata zemřelá nebo umírající se vyšetří na defekty.

#### 1.3.5.2 Histopatologická vyšetření

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné vajíčky, koagulační žláza, prostata, hypofýza a cílové orgány všech zvířat generace P se uchovávají pro mikroskopické vyšetření. V případě, že tyto orgány nebyly doposud

vyšetřeny v jiných mnohadávkových studiích, provede se mikroskopické vyšetření u všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny dostávající nejvyšší dávku a dále u zvířat, která zemřela v průběhu pokusu.

Orgány, které jeví abnormality u těchto skupin zvířat, se vyšetří i u P zvířat ostatních dávkových skupin. V těchto případech se mikroskopicky vyšetřují všechny tkáně makroskopicky postižené. Jak již bylo uvedeno, reprodukční orgány zvířat podezřelých z neplodností se mají též podrobit mikroskopické analýze.

## 2. ÚDAJE

Data se sumarizují v tabulkách, kde je uveden pro každou dávkovou skupinu počet zvířat na začátku pokusu, počet plodných samců, počet těhotných samic, typ změn a procento zvířat nesoucích tyto změny.

Numerické výsledky mají být statisticky zpracovány příslušnou statistickou metodou. Může se použít kterákoliv obecně přijímaná statistická metoda.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o experimentu

Zpráva o experimentu by měla pokud možno obsahovat následující údaje:

- druh /kmen použitých zvířat,
- údaje o toxické odezvě v závislosti na dávce a pohlaví, včetně ukazatelů plodností, gestace a životaschopnosti,
- dobu uhynutí v průběhu studie nebo zda zvířata přežila do ukončení pokusu,
- tabulka uvádějící hmotnost každého vrhu, průměrnou hmotnost jednotlivých mlád'at a konečnou individuální hmotnost potomků,
- toxické a další účinky na reprodukci, potomstvo a postnatální růst,
- den, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- tělesná hmotnost zvířat P generace,
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech mikroskopických nálezů,
- statistické zpracování všech údajů, pokud je možné,
- diskuse výsledků
- interpretace výsledků.



## **B.35 REPRODUKČNÍ TOXICITA - DVOUGENERAČNÍ TEST**

### 1. METODA

#### 1.1 Princip testovací metody.

Testovaná látka se podává několika skupinám samic a samců v odstupňovaných dávkách.

Samci rodičovské (P) generace dostávají testovanou látku v době růstu a alespoň v průběhu jednoho spermatogenního cyklu (přibližně 56 dnů u myší a 70 dnů u potkanů), aby byl zachycen jakýkoliv nepříznivý účinek testované látky na spermatogenezi.

Samice rodičovské generace (P) dostávají látku po dobu alespoň dvou estrálních cyklů, aby byl zachycen jakýkoliv nepříznivý účinek testované látky na estrus.

Zvířata jsou poté připuštěna. V době připouštění se testovaná látka podává zvířatům obou pohlaví a potom, v době gravidity a kojení, pouze samicím. Po odstavení je látka podávána zvířatům filialní generace F<sub>1</sub> v průběhu růstu do dospělosti, v době páření a až do doby odstavení F<sub>2</sub> generace.

Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

#### 1.2 Popis testovací metody.

##### 1.2.1 Příprava

Před zahájením testu jsou zdravá zvířata náhodně rozdělena do dvou skupin - kontrolní a exponované skupiny. Rodičovská zvířata (P) jsou chována nejméně 5 dnů před zahájením pokusu v těch podmínkách ustájení a krmení, v jakých budou během experimentu. Doporučuje se testovanou látku podávat v potravě nebo v pitné vodě. Jiné způsoby podání jsou také možné. Všechna zvířata látku dostávají stejným způsobem v průběhu celého testu. Pokud se používá k usnadnění aplikace vehikulum nebo jiné aditivum, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky. Látka se aplikuje 7 dní v týdnu.

##### 1.2.2 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům nebo myším. Používají se zdravá P zvířata, do té doby nepoužitá pro jiné experimenty. Nepoužívá se kmenů s nízkou plodností. Musí být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví a váhy nebo věku. Plodnost musí být ověřena u obou pohlaví. Zvířata v obou skupinách, exponované a kontrolní, musí být odstavena před zahájením aplikace.

##### 1.2.3 Počet a pohlaví

Každá exponovaná i kontrolní skupina musí mít dostatečný počet zvířat, aby bylo zaručeno cca 20 březích samic s přibližně stejným termínem porodu. Cílem je získat dostatečný počet těhotenství a potomstva, a tím zajistit spolehlivé hodnocení vlivu látky na plodnost, průběh gravidity a mateřské chování, kojení, růst a vývoj

potomstva generace  $F_1$  od početí do dospělosti, a vývoj jejich potomstva generace  $F_2$  až do odstavení.

#### 1.2.4 Podmínky testu

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před porodem se těhotné samice přemísťují do zvláštních porodních nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

#### 1.2.5 Dávkování

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Pokud se používá pro aplikaci testované látky vehikulum, pak zvířata kontrolní skupiny dostávají vehikulum v největším použitém objemu. Pokud testovaná látka snižuje příjem a utilizaci potravy, je třeba uvážit použití další kontrolní skupiny, spárované co do výživy.

Testovaná látka v nejvyšší koncentraci má v ideálním případě, pokud to dovolí fyzikálně-chemické vlastnosti látky a její biologické účinky, vyvolávat toxicitu a nikoli mortalitu v rodičovské populaci. Střední dávka(y) by měla(y) vyvolat minimální toxické účinky, které by se daly připsat testované látce, a nejnižší dávka by neměla vyvolávat žádné pozorovatelné nepříznivé účinky ani u rodičů ani u potomstva.

Při podání sondou nebo v tobolkách se dávka stanoví na základě individuální hmotnosti zvířete a přizpůsobuje se každý týden podle změny hmotnosti. V případě těhotných samic, dávky mohou být případně určeny na základě tělesné hmotnosti v 0. nebo 6.dni od začátku těhotenství.

#### 1.2.6 Limitní test

V případě látek s nízkou toxicitou, pokud se ani dávka  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  neprojevuje žádným toxickým účinkem na reprodukci, nemusí se provádět studie na jiných dávkových úrovních. Pokud předběžná studie ukáže, že vysoká dávka, vyvolávající jasnou mateřskou toxicitu, nemá nepříznivé účinky na plodnost, není nutné provádět studie na jiných dávkových úrovních.

### 1.3 Popis postupu

#### 1.3.1 Plán pokusu

Denní aplikace samcům rodičovské generace P začne ve věku pěti až devíti týdnů, aspoň po pětidenní aklimatizaci po odstavení. U potkanů aplikace pokračuje deset týdnů před obdobím připouštění (8 týdnů pro myši). Samci se buď utratí a vyšetří na konci období připouštění nebo se pokračuje v aplikaci a jsou použiti pro případnou produkci dalších vrhů a jsou utraceni a vyšetřeni někdy před koncem pokusu.

Denní aplikace samicím rodičovské generace P začne po pětidenní aklimatizaci a pokračuje aspoň dva týdny před obdobím připouštění. Denní aplikace pokračuje pak po celé tři týdny období připouštění, v době gravidity až do odstavení  $F_1$  potomstva. Je přípustná změna dávkovacího plánu podle znalostí o vlastnostech studované látky, např. o indukci metabolismu resp.o bioakumulaci.

Aplikace zvířatům generace  $F_1$  začíná po odstavení a končí jejich utracením.

### 1.3.2 Postup při připouštění

Je možno použít párování 1:1 (jedna samice a jeden samec) anebo 1:2 (jeden samec ke dvěma samicím).

V případě 1:1 párování, samice se ponechá s tímž samcem ve společné kleci do otěhotnění anebo po dobu 3 týdnů. Každé ráno jsou samice vyšetřeny na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 těhotenství je definován jako den nálezu vaginální zátky nebo spermatu.

Vzhledem k vývoji spermiogeneze, zvířata generace  $F_1$  se nepoužívají pro připouštění do věku 11 týdnů u myší a 13 týdnů u potkanů. Pro připouštění zvířat generace  $F_1$  se náhodně vyberou páry z různých vrhů téže dávkové skupiny. Zvířata nepoužitá se utratí po odstavu.

Dvojice, u kterých nedojde k oplodnění, je třeba vyšetřit s cílem zjistit důvod neplodnosti páru. To je možné buď poskytnutím další příležitosti k oplodnění s osvědčenými jedinci obou pohlaví nebo mikroskopickým vyšetřením reprodukčních orgánů nebo vyšetřením estrálního cyklu a spermatogenezy.

### 1.3.3 Velikost vrhů

Zvířatům použitým pro vyšetření plodnosti je ponechána možnost porodit normálně a pečovat o své potomstvo do okamžiku odstavení bez standardizace velikosti vrhů. Pokud se velikost vrhů standardizuje, je třeba dodržet následující postup: mezi 1. a 4. dnem po porodu se velikost všech vrhů upraví vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby se dosáhlo počtu 4 samců a 4 samic na vrh; pokud to není proveditelné, je možno standardizovat na jiné počty, např. 5 samců a 3 samice. Vrhů menší než 8 nelze standardizovat. Standardizace vrhů generace  $F_2$  se provede obdobně.

### 1.3.4 Pozorování

Každé zvíře má být pozorováno alespoň jednou za den. Významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého porodu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality, se zaznamenávají. Příjem potravy se měří týdně jak před, tak během doby připouštění. Během gravidity je vhodné kontrolovat příjem potravy denně. Po porodu a v průběhu laktace se měří příjem potravy ve stejný den, kdy je potomstvo váženo. Rodičovská P a  $F_1$  zvířata se váží první den aplikace a pak týdně. Všechna pozorování se zaznamenávají individuálně pro každé dospělé zvíře.

Doba gestace se počítá od dne 0 těhotenství. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mlád'at, počet mrtvých a živých porodů a přítomnost hrubých anomalií.

Mrtvá mlád'ata a mlád'ata utracená ve čtvrtém dnu se uchovávají pro vyšetření na možné defekty. Živá mlád'ata se spočítají a celé vrhy se zváží ráno po porodu, ve 4. a 7. dnu a potom každý týden do ukončení studie, kdy jsou zvířata zvážena individuálně. Pozorují se a zaznamenávají všechny abnormality v chování a fyzickém stavu matek a potomstva.

### 1.3.5 Patologie

#### 1.3.5.1 Pitva

Všechna dospělá zvířata generací P a F<sub>1</sub> se utrácí, jakmile není nutné je déle uchovávat pro posouzení účinků látky na reprodukci. Zvířata generace F<sub>1</sub> nevybraná pro připouštění a všechna zvířata generace F<sub>2</sub> se utratí po odstavení.

Po utracení nebo úmrtí se všechna rodičovská zvířata P a F<sub>1</sub> makroskopicky vyšetří na strukturní abnormality anebo patologické změny, se zvláštní pozorností k orgánům reprodukčního systému. Mladata uhynulá nebo moribundní se vyšetří na defekty.

#### 1.3.5.2 *Histopatologické vyšetření*

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné kanálky, koagulační žláza, prostata, hypofyza a další cílové orgány všech zvířat generací P a F<sub>1</sub> se uchovají pro mikroskopické vyšetření. V případě, že tyto orgány nebyly doposud vyšetřeny v jiných mnohadávkových studiích, provede se mikroskopické vyšetření u všech P a F<sub>1</sub> zvířat kontrolní skupiny a skupiny dostávající nejvyšší dávku, která byla vybrána pro připouštění, a dále u zvířat, která zemřela v průběhu pokusu. Orgány, které jeví abnormality u těchto skupin zvířat, se vyšetří i u zvířat ostatních dávkových skupin. V těchto případech se mikroskopicky vyšetřují všechny tkáně makroskopicky postižené. Jak již bylo uvedeno, reprodukční orgány zvířat podezřelých z neplodností se mají též podrobit mikroskopické analýze.

## 2. ÚDAJE

Údaje se sumarizují v tabulkách, kde je uveden pro každou dávkovou skupinu počet zvířat na začátku pokusu, počet těhotných samic, typ změn a procento zvířat nesoucích tyto změny.

Numerické výsledky mají být zpracovány příslušnou statistickou metodou. Může se použít kterákoliv obecně přijímaná statistická metoda.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o experimentu

Zpráva o experimentu by měla pokud možno obsahovat následující údaje:

- druh /kmen použitých zvířat,
- údaje o toxické odezvě v závislosti na dávce a pohlaví, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a životaschopnosti,
- dobu uhynutí v průběhu studie nebo zda zvířata přežila do ukončení pokusu,
- tabulka uvádějící hmotnost u každého vrhu, průměrnou hmotnost jednotlivých mlád'at a individuální hmotnost potomků před utracením,
- toxické a další účinky na reprodukci, potomstvo a postnatální růst,
- den, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky a jejich další vývoj,
- tělesná hmotnost zvířat P a F<sub>1</sub> generace, vybraných pro připouštění,
- pitevní nálezy,
- detailní popis všech mikroskopických nálezů, - statistické zpracování všech údajů, pokud je možné,
- diskuse výsledků,
- interpretace výsledků.

## **B.36 TOXIKOKINETIKA**

### 1. METODIKA

#### 1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává vhodnou cestou. V závislosti na zaměření studie látka může být podávána jednorázově nebo opakovaně v průběhu stanovené doby, jedné nebo několika skupinám experimentálních zvířat. Látka resp. její metabolity jsou pak podle účelu studie stanovovány v tělních tekutinách, tkáních anebo v exkretech.

Studie mohou být prováděny s “neznačenou“ či “značenou“ formou testované látky. Jestliže je použito značení, umístí se tak, aby poskytlo co nejvíce informací o osudu sloučeniny v organismu.

#### 1.2 Popis testovací metody

##### 1.2.1 Přípravy

Zdravá mladá zvířata jsou aklimatizována na laboratorní podmínky nejméně po dobu pěti dnů před testováním. Před zahájením testování jsou zvířata náhodně rozdělena do skupin. Pro řešení speciálních otázek se může použít velmi mladých, pregnantních či premedikovaných zvířat.

##### 1.2.2 Experimentální podmínky

###### 1.2.2.1 Pokusná zvířata

Toxikokinetické studie se provádějí na jednom či více vhodných živočišných druzích. Měly by se provádět na druzích užívaných nebo uvažovaných pro užití v jiných toxikologických studiích zabývajících se testovanou látkou. Jestliže jsou pro testování používáni hlodavci, neměla by být variabilita hmotnosti vyšší než  $\pm 20\%$  průměrné hodnoty.

###### 1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro studium absorpce a vylučování se užije nejprve 4 zvířat pro každou jednotlivou dávku. Pro testování není dáována přednost určitému pohlaví, ale za určitých podmínek může vzniknout potřeba provádět studie na obou pohlavích. Jestliže jsou nalezeny rozdílné odpovědi u různých pohlaví, potom je třeba testovat 4 zvířata každého pohlaví. V případě ostatních druhů zvířat (jiných než hlodavců) je možné použít menší počet zvířat.

Je-li studována tkáňová distribuce, pak při určení počáteční velikosti skupiny zvířat je třeba brát v úvahu jak počet zvířat, která budou utracena v každém časovém bodu, tak počet časových bodů v nichž bude testování prováděno.

Je-li studován metabolismus, pak velikost skupiny zvířat je úměrná potřebám studie.

Zahrnuje-li studie větší počet dávek a sledovaných časových intervalů, pak velikost skupiny zvířat by měla počítat s počtem časových intervalů a plánovaným utrácením

zvířat, ale ve skupině nesmí být méně než 2 zvířata. Velikost skupiny zvířat by měla být dostatečná na to, aby pro látku resp. její metabolity poskytla přijatelné charakteristiky ve fázi retence, rovnovážného stavu a deplece.

#### 1.2.2.3 *Dávky*

V případě jednorázového podání by měly být použity nejméně 2 různé dávky testované látky. Měla by to být nízká dávka látky, po které nebyly pozorovány žádné toxické účinky a vysoká dávka, po které mohou být nalezeny změny v toxikokinetických parametrech nebo která vyvolává toxické účinky.

V případě opakovaného podávání je většinou dostatečné podání nízkých dávek látky. Za určitých podmínek může být nezbytné i podávání vysoké dávky.

#### 1.2.2.4 *Způsob aplikace*

Toxikokinetické studie by měly být prováděny stejným způsobem aplikace a je-li to vhodné i se stejným vehikulem tak, jak jsou používány v ostatních toxikologických studiích. Testovaná látka je obvykle podávána orálně sondou nebo v potravě, aplikována na kůži, nebo podávána inhalačně po určenou dobu skupině experimentálních zvířat. Intravenosní podání testované látky může být užitečné pro stanovení relativního vstřebávání při jiných způsobech aplikace. Navíc, krátce po intravenosní aplikaci látky mohou být získány důležité informace o distribuci látky v organismu.

Nemělo by se zapomínat na možnou interferenci vehikula s testovanou látkou. Pozornost by měla být rovněž věnována rozdílům ve vstřebávání v případě, je-li testovaná látka podána sondou nebo v potravě, a potřebě přesného stanovení dávky, zvláště je-li testovaná látka podávána v potravě.

#### 1.2.2.5 *Doba sledování*

Všechna zvířata by měla být sledována denně a příznaky toxicity i další relevantní klinické údaje zaznamenávány spolu s údaji o jejich počátku, velikosti a trvání.

### 1.3 *Popis postupu*

Po zvážení pokusných zvířat je testovaná látka podána způsobem přiměřeným účelu. Ve zdůvodněných případech je možno nechat zvířata před podáním testované látky vyhladovět.

#### 1.3.1 *Absorpce*

Ke sledování rychlosti a rozsahu absorpce podávané látky mohou být použity různé metody s nebo bez referenční skupiny<sup>1</sup>, a to např.:

- stanovení množství testované látky a ev. jejích metabolitů v exkretách např. v moči, žluči, stolici, vydechovaném vzduchu a také jejích zbytků v karkasu,
- porovnání biologické odpovědi ( např. studie akutní toxicity) mezi testovanou a kontrolní a případně referenční skupinou,

---

<sup>1</sup> V této metodě se referenční skupinou rozumí ta, ve které je testovaná látka podávána takovým způsobem, který zajišťuje úplnou biologickou dostupnost dávky

- porovnání množství látky resp. jejích metabolitů vylučovaných ledvinami mezi testovanou a kontrolní a případně referenční skupinou,
- stanovení plochy pod křivkou závislosti koncentrací testované látky a ev. jejích metabolitů v plazmě na čase a porovnání s daty získanými v referenční skupině.

### 1.3.2 Distribuce

V současné době jsou dostupné 2 přístupy, z nichž pro analýzu distribučního schematu mohou být použity jeden či oba:

- při použití celotělové autoradiografie lze získat užitečné kvalitativní informace;
- kvantitativní informace poskytuje stanovení koncentrací a množství testované látky a ev. jejích metabolitů v tkáních a orgánech získaných ze zvířat v různých časových intervalech po zahájení expozice.

### 1.3.3 Vylučování

Při studiu vylučování se sbírá moč, stolice, vydechovaný vzduch, v určitých případech žluč. Množství testované látky a ev. jejích metabolitů se v těchto exkretech stanovuje několikrát po podání látky, a to buď do vyloučení 95 % z podaného množství nebo nejvýše 7 dnů od počátku vylučování.

Ve speciálních případech může být potřebné sledovat také vylučování testované látky v mléce v době laktace testovaných zvířat.

### 1.3.4 Metabolismus

K určení rozsahu a schematu metabolismu látky se biologické vzorky analyzují vhodnými technikami. Měla by být objasněna struktura metabolitů a navrženo odpovídající metabolické schema tam, kde je třeba odpovědět na otázky z předcházejících toxikologických studií. Pro získání informací o metabolismu může být prospěšné provedení *in vitro* studií.

Další informace o vztahu mezi metabolismem a toxicitou látky lze získat z biochemických studií např. studiem účinků látky na enzymy metabolického systému, sledováním poklesu endogenních neproteinových sloučenin obsahujících -SH skupiny a nebo vazby látky na makromolekuly.

## 2. ÚDAJE

Získané údaje se podle typu prováděné studie sumarizují v tabulkách, pokud možno doplněných grafickým znázorněním.

Pro každou testovanou skupinu se uvedou průměry a charakteristiky variability ve vztahu k času, dávce, tkáni a orgánům (pokud je to relevantní). Stupeň vstřebání a množství a rychlost vylučování se stanoví vhodnými metodami. V případě metabolických studií by měla být identifikována struktura metabolitů a navrženy metabolické cesty studované látky.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### 3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Podle typu prováděné studie by zpráva o testu měla obsahovat pokud možno následující údaje:

- živočišný druh, kmen, zdroj, životní podmínky, výživa,
- charakteristika značeného materiálu, jestliže byl použit,
- velikost dávky a intervaly podání,
- způsob(y) podání a všechna použitá vehikula,
- toxické a i ostatní pozorované účinky,
- metody stanovení testované látky a ev. jejích metabolitů v biologickém materiálu včetně vydechovaného vzduchu,
- tabulky výsledků rozdělené podle pohlaví, dávky, režimu, času, tkání a orgánů,
- uvedení rozsahu vstřebávání a vylučování v závislosti na čase,
- metody užití pro charakterizaci a identifikaci metabolitů v biologickém materiálu,
- metody užití pro biochemická stanovení týkající se metabolismu,
- navrhované schéma pro metabolismus,
- diskusi výsledků,
- interpretaci výsledků.



## **B.37 POZDNÍ NEUROTOXITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU - AKUTNÍ EXPOZICE**

### 1. METODA

#### 1.1 Úvod

Při stanovení a vyhodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určité skupiny látek vyvolat specifický typ neurotoxicity, který nemůže být zjištěn v jiných studiích toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byly pozorovány zpožděné projevy neurotoxicity a mají být testovány touto metodou.

Vyšetřovací testy *in vitro* mohou být použity pro vyhledávání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii. Negativní nález z *in vitro* studií však není možno považovat za důkaz, že látka není neurotoxická.

#### 1.2 Definice

Do skupiny látek označených v názvu této metody jako "organické sloučeniny fosforu" patří elektricky neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu, pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se ataxií, distální axonopatií, změnami v míše a periferním nervu s pozdním počátkem těchto příznaků, a dále inhibicí a stárnutím specifické esterázy - NTE (neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

#### 1.3 Referenční látky

Referenční látka může být testována na pozitivní kontrolní skupině k průkazu, že v laboratorních podmínkách se reakce testovaných druhů podstatně nezměnila.

Příkladem široce používané látky s pozdním neurotoxickým účinkem je tri-o-tolylfosfát (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, chemický název: tris(2-metylfenyl)ester kyseliny fosforečné, syn: tri-o-kresylfosfát (TOCP).

#### 1.4 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává orálně v jediné dávce slepicím, chráněným před možnými akutními cholinergními účinky. Zvířata se po dobu 21 dnů pozorují, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a paréza. Biochemické vyšetření, zvláště inhibice NTE, se provádí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. 21 dnů po podání látky jsou zbývající slepice utraceny a je provedeno histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

#### 1.5 Popis metody testování

##### 1.5.1 Příprava

Mladé zdravé dospělé slepice bez interferujících virových onemocnění a farmakologické léčby a s normální chůzí se náhodně přiřadí do experimentální a kontrolní skupiny. Nejméně 5 dní před zahájením studie jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Testovaná látka se podává orálně sondou, želatinovými tobolkami nebo jinou srovnatelnou metodou. Tekutiny se podávají neředěné nebo rozpuštěné v vhodném vehikulu jako je např. kukuřičný olej, pevné se doporučuje rozpustit, neboť velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. U nevodných nosičů musí být známy nebo určeny před testem jejich toxikologické vlastnosti.

## 1.6 Experimentální podmínky

### 1.6.1.1 Pokusná zvířata

Doporučuje se mladá nosnice *kura domácího* (*Gallus gallus domesticus*) ve věku 8 až 12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a chovají se za podmínek, které dovolují volný pohyb.

### 1.6.1.2 Počet a pohlaví

Kromě testovací skupiny se použije jak kontrolní skupina s vehikulem, tak pozitivní kontrolní skupina. S výjimkou aplikace testované látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako s pokusnými.

V každé skupině má být dostatečný počet slepic, aby aspoň šest z nich mohlo být utraceno pro biochemické vyšetření (po třech prvý a druhý den po podání) a šest přežilo 21 denní pozorování.

Pozitivní kontrolní skupina se může testovat souběžně nebo se může použít kontrolní skupina z nedávné historie. Má mít aspoň šest slepic, kterým se podává látka vyvolávající pozdní neurotoxicitu, tři slepice jsou určeny pro biochemii a tři slepice pro histologii. Doporučuje se periodicky doplňovat historické údaje, když se v provádějící laboratoři změní některý ze základních prvků testu (např. plemeno, potrava, podmínky chovu).

### 1.6.1.3 Volba dávek

Má být provedena předběžná studie s využitím příslušného počtu slepic a skupin v různých úrovních dávek, aby se dala stanovit úroveň, která bude použita v hlavní studii. Určitá úmrtnost je v této předběžné studii nezbytná pro stanovení přiměřené dávky v hlavní studii. Aby se zabránilo úmrtí pro akutní cholinergní účinky, používá se atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že neinterferuje s pozdními neurotoxickými účinky. K odhadu maximální neletální dávky testovaných látek může být použito různých typů testovacích metod (viz metoda B.1 bis). Historické údaje pro slepice nebo jiné toxikologické informace mohou být také nápomocné při výběru dávky.

Úroveň dávky testované látky v hlavní studii by měla být co nejvyšší s přihlédnutím k výsledkům předběžné studie výběru dávky a hornímu limitu dávky  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Případné úhyny by neměly ovlivnit přežití dostatečného počtu zvířat pro biochemii (šest) a po 21 dnech pro histologii (šest). Atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že neinterferuje s pozdními neurotoxickými účinky, se má použít jako ochrana před akutními cholinergními účinky.

#### 1.6.1.4 *Limitní test*

Jestliže test s dávkou nejméně  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti, za použití postupů popsaných pro tuto studii, nevyvolá žádné pozorované toxické účinky a jestliže podle údajů u látek s příbuznou strukturou není důvod toxicitu očekávat, pak není třeba uvažovat o studii s podáním vyšší dávky. Limitní test se neprovádí, pokud expozice vyskytující se u lidí naznačuje potřebu použití ještě vyšší úrovně dávky.

#### 1.6.1.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování je 21 dnů.

#### 1.6.2 *Popis postupu*

Po aplikaci prostředku, ochraňujícího před úmrtím na následky akutního cholinergního účinku, je testovaná látka podána v jediné dávce.

#### 1.6.2.1 *Všeobecné pozorování*

Pozorování má začít okamžitě po podání látky. Všechny slepice se pečlivě pozorují několikrát v průběhu prvních dvou dnů a pak aspoň jednou denně po dobu 21 dní nebo dokud nebudou utraceny podle plánu. Veškeré příznaky toxicity se zaznamenávají, včetně nástupu, typu, stupně a trvání abnormálního chování. Ataxie se hodnotí podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice vykazující patologické změny vyjmou z klecí a vystaví nucené motorické aktivitě jako např. vystupování po žebříku, aby se usnadnilo posouzení minimálních toxických účinků. Umírající zvířata a zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba vyřadit, humánním způsobem utratit a pitvat.

#### 1.6.2.2 *Tělesná hmotnost*

Všechny slepice se zváží těsně před podáním testované látky a pak aspoň jednou týdně.

#### 1.6.2.3 *Biochemie*

Šest slepic náhodně vybraných z každé testované a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny (je-li skupina použita) se usmrtí v prvních dnech po aplikaci látky. Pro analýzu inhibice NTE se vyjmou mozek a lumbální mícha. Je vhodné vypreparovat také *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici NTE. Běžně se usmrcují tři slepice z kontrolní a každé testované skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách, tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrcují pouze po 24 hodinách. Jestliže pozorování klinických příznaků naznačuje,

že toxická látka se v organismu pohybuje velmi pomalu (hodnotí se nástup cholinergních příznaků), pak je výhodnější odebrat vzorky tkáně dvakrát ze tří zvířat, a to mezi 24 až 72 hodinami po podání látky.

U těchto vzorků tkáně se případně provede také analýza acetylcholinesterázy (AChE). *In vivo* může však nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

#### 1.6.2.4 *Pitva*

Pitva všech zvířat (plánovaně usmrčených i utracených pro špatný celkový stav) zahrnuje makroskopické posouzení stavu mozku a míchy.

#### 1.6.2.5 *Histopatologické vyšetření*

Nervová tkáň z přeživších zvířat (nepoužitých pro biochemické studie) se histologicky vyšetří. Tkáň se fixují *in situ* za použití perfúzních technik. Odebírá se: mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha - řezy míchy se provádějí v horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální, z periferních nervů se odebírá distální část z *n. tibialis* (a jeho větve k *m.gastrocnemius*) a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví specifickými barvivy na myelin a axony.

## 2. SBĚR A ZÁZNAM ÚDAJŮ

Negativní výsledky o účincích sledovaných touto metodou (biochemie, histopatologie a změny chování) běžně nevyžadují další testování na pozdní neurotoxicitu. Neprůkazné nebo neurčité výsledky mohou vyžadovat další sledování.

Uvádějí se údaje pro jednotlivá zvířata. Údaje se dále sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu a počet zvířat jevících poškození, změny chování nebo biochemické účinky, typy a stupeň těchto poškození nebo účinků a procento zvířat vykazujících každý typ a stupeň poškození nebo účinku.

Výsledky studie se vyhodnotí z hlediska výskytu, závažnosti a korelace mezi změnami chování, biochemickými a histopatologickými nálezy a dalšími pozorovanými jevy u testovaných a kontrolních skupin.

Číselné výsledky je třeba vyhodnotit vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody se zvolí již v době plánování studie.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### Zpráva o průběhu pokusu

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

*Testovaná zvířata:*

- použité plemeno;
- počet a stáří zvířat;
- zdroj, podmínky ustájení atd.;

- hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku studie.

*Podmínky testování:*

- podrobné údaje o přípravě, stabilitě a homogenitě testované látky;
- zdůvodnění výběru vehikula;
- podrobné údaje o způsobu aplikace testované látky;
- podrobné údaje o potravě a kvalitě vody;
- zdůvodnění vybrané úrovně dávek;
- specifikace podávaných dávek, včetně podrobných údajů o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikované látky;
- podrobné údaje o podání ochranného přípravku.

*Výsledky:*

- údaje o tělesné hmotnosti;
- údaje o toxických odpovědích podle dávkových skupin, včetně úmrtnosti;
- charakter, stupeň a trvání klinických příznaků (at' vratných nebo nevratných);
- podrobný popis biochemických vyšetření a jejich výsledky;
- pitevní nálezy;
- podrobný popis všech histopatologických nálezů;
- statistické vyhodnocení výsledků, u kterých je to možné.

*Diskuse výsledků*

*Hodnocení a Interpretace.*

#### 4. LITERATURA

Tato metoda je analogická s metodou OECD TG 418.

## **B.38 POZDNÍ NEUROTOXITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE**

### 1. METODA

#### 1.1 Úvod

Při stanovení a vyhodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určité skupiny látek vyvolat specifický typ neurotoxicity, který nemůže být zjištěn v jiných studiích toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byly pozorovány zpožděné projevy neurotoxicity a mají být testovány touto metodou.

Vyšetřovací testy *in vitro* mohou být použity pro vyhledávání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii. Negativní nález z *in vitro* studií však není možno považovat za důkaz, že látka není neurotoxická.

Tento 28denní test pozdní neurotoxicity poskytuje informace o možném zdravotním riziku vznikajícím z expozic opakovaných během určitého krátkého časového období. Poskytne informace o závislosti odpovědi na dávce a může poskytnout odhad rozpětí dávkových úrovní, ve kterém nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky. Tato úroveň se používá pro stanovení kritérií bezpečné expozice.

#### 1.2 Definice

Do skupiny látek označených v názvu této metody jako “organické sloučeniny fosforu“ patří elektricky neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu, pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se ataxií, distální axonopatií, změnami v míše a periferním nervu s pozdním počátkem těchto příznaků, a dále inhibicí a stárnutím specifické esterázy – NTE (neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

#### 1.3 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává denně orálně slepicím po dobu 28 dnů. Zvířata jsou sledována nejméně jednou denně, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a paréza ještě 14 dnů po poslední dávce. Biochemické vyšetření, zvláště inhibice NTE, se provádí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny 24 a 48 hodin po posledním podání látky. Dva týdny po poslední dávce jsou zbývající slepice utraceny a je provedeno histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

#### 1.4 Popis testovací metody

##### 1.4.1 Příprava

Mladé zdravé dospělé slepice bez interferujících virových onemocnění a farmakologické léčby a s normální chůzí se náhodně přiřadí do experimentální a kontrolní skupiny. Nejméně 5 dní před zahájením studie jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Testovaná látka se podává orálně, denně 7 dní v týdnu, buď sondou, želatinovými tobolkami nebo jinou srovnatelnou metodou. Tekutiny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu jako je např. kukuřičný olej. Pevné se doporučuje rozpustit, neboť velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. U nevodných nosičů musí být známy nebo určeny před testem jejich toxikologické vlastnosti.

#### 1.4.2 Experimentální podmínky

##### 1.4.2.1 Pokusná zvířata

Doporučuje se mladá nosnice *kura domácího* (*Gallus gallus domesticus*) ve věku 8 až 12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a chovají se za podmínek, které dovolují volný pohyb.

##### 1.4.2.2 Počet a pohlaví

Je třeba použít nejméně tři úrovně dávek a jednu kontrolní skupinu s vehikulem. S výjimkou aplikace testované látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako s pokusnými.

V každé skupině má být dostatečný počet slepic, aby aspoň šest z nich mohlo být utraceno pro biochemické vyšetření (po třech v každém ze dvou časových bodů) a šest přežilo čtrnáctidenní pozorování po ukončení expozice.

##### 1.4.2.3 Volba dávek

Dávkové úrovně se zvolí s přihlédnutím ke třem výsledkům z akutního testu na pozdní neurotoxicitu a k dalším údajům o toxicitě nebo kinetice testované látky. Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxické účinky, nejlépe příznaky pozdní neurotoxicity, nezpůsobit žádné uhynutí ani zřejmé utrpení. Dále se zvolí řada klesajících dávek způsobem, který umožní sledovat závislost účinku na dávce. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity.

##### 1.4.2.4 Limitní test

Jestliže test s dávkou nejméně 1000 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti a den, za použití postupů popsanych pro tuto studii, nevyvolá žádné pozorované toxické účinky a jestliže podle údajů u látek s příbuznou strukturou není důvod toxicitu očekávat, pak není třeba uvažovat o studii s podáním vyšší dávky. Limitní test se neprovádí, pokud expozice vyskytující se u lidí naznačuje potřebu použití ještě vyšší úrovně dávky.

#### 1.4.2.5 *Doba pozorování*

Všechna zvířata se pozorují nejméně jednou denně po dobu expozice a 14 dnů po ní, nebo do utracení a do pitvy podle plánu.

#### 1.4.3 *Popis postupu*

Testovaná látka se podává sedm dní v týdnu po 28 dnů.

##### 1.4.3.1 *Všeobecné pozorování*

Pozorování má začít okamžitě po začátku podání látky. Všechny slepice se pečlivě pozorují nejméně jednou denně po 28 dnů a dalších 14 dnů po ukončení aplikace, do utracení podle plánu. Veškeré příznaky toxicity se zaznamenávají, včetně nástupu, typu, stupně a trvání. Pozorování má zahrnovat abnormality chování, ale nemá se na ně omezovat. Ataxie se hodnotí podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice, zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice vyjmou z klecí a vystaví nucené motorické aktivitě, jako např. vystupování po žebříku, aby se usnadnilo posouzení minimálních toxických účinků. Umírající zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba vyloučit, humánním způsobem utratit a pitvat.

##### 1.4.3.2 *Tělesná hmotnost*

Všechny slepice se zváží těsně před prvním podáním testované látky a pak alespoň jednou týdně.

##### 1.4.3.3 *Biochemie*

Šest slepic náhodně vybraných z každé testované a kontrolní skupiny s vehikulem se usmrtí v prvních dnech po aplikaci poslední dávky. Pro analýzu inhibice NTE se vyjmou mozek a lumbální mícha. Je vhodné vypreparovat také *n.ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici NTE. Obvykle se usmrcují tři slepice z kontrolní a každé testované skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách po posledním podání dávky. Jestliže údaje z akutní studie nebo jiných studií (např. toxikokinetických) naznačují, že je výhodnější jiná doba usmrcení po poslední aplikaci, pak se doporučuje použít tuto dobu a zdůvodnění uvést v dokumentaci.

U těchto vzorků tkáně se případně provede také analýza acetylcholinesterázy (AChE). *In vivo* může však nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

##### 1.4.3.4 *Pitva*

Pitva všech zvířat (plánovaně usmrcených i utracených pro špatný celkový stav) zahrnuje makroskopické posouzení stavu mozku a míchy.

##### 1.4.3.5 *Histopatologické vyšetření*

Nervová tkáň z přeživších zvířat (nepoužitých pro biochemické studie) se histologicky vyšetří. Tkáň se fixují *in situ* za použití perfúzních technik. Odebírá se: mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha (řezy míchy se



provádí v horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální), z periferních nervů se odebrává distální část z *n. tibialis* (a jeho větve k *m.gastrocnemius*) a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví specifickými barvivy na myelin a axony.

Nejprve se vyšetří fixované tkáně všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s nejvyšší dávkou. Pokud se najdou u zvířat skupiny s nejvyšší dávkou známky účinku, provede se histologické vyšetření i na slepicích ze skupin, které dostaly dávku střední a nízkou.

## 2. SBĚR A ZÁZNAM ÚDAJŮ

Pokud jsou výsledky získané touto metodou (biochemie, histopatologie a změny chování) negativní, běžně se neprovádí další testování na pozdní neurotoxicitu. Neprůkazné nebo neurčité výsledky mohou vyžadovat další sledování.

Uvádějí se údaje pro jednotlivá zvířata. Údaje se dále sestaví do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet zvířat na počátku pokusu a počet zvířat jevících poškození, změny chování nebo biochemické účinky, typy a stupeň těchto poškození nebo účinků a procento zvířat vykazujících každý typ a stupeň poškození nebo účinku.

Výsledky studie se vyhodnotí z hlediska výskytu, závažnosti a korelaci mezi změnami chování, biochemickými a histopatologickými nálezy a dalšími pozorovanými jevy u testovaných a kontrolních skupin.

Číselné výsledky je třeba vyhodnotit vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody se zvolí již v době plánování studie.

## 3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

### Zpráva o průběhu pokusu

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

#### *Testovaná zvířata:*

- použité plemeno,
- počet a stáří zvířat,
- zdroj, podmínky ustájení atd.,
- hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku studie.

#### *Podmínky testování:*

- podrobné údaje o přípravě, stabilitě a homogenitě testované látky,
- zdůvodnění výběru vehikula,
- podrobné údaje o způsobu aplikace testované látky,
- podrobné údaje o potravě a kvalitě vody,
- zdůvodnění vybrané úrovně dávek,
- specifikace podávaných dávek, včetně podrobných údajů o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikované látky,
- zdůvodnění doby pro odběr na biochemické vyšetření, je-li jiná než 24 a 48 hodin.

*Výsledky:*

- údaje o tělesné hmotnosti,
- údaje o toxických odpovědích podle dávkových skupin, včetně úmrtnosti,
- úroveň bez účinku (NOAEL),
- charakter, stupeň a trvání klinických příznaků (at' vratných nebo nevratných),
- podrobný popis biochemických vyšetření a jejich výsledky,
- pitevnické nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, u kterých je to možné.

*Diskuse výsledků**Hodnocení a Interpretace*

## 4. LITERATURA

Tato metoda je analogická s metodou OECD TG 419.

## OBSAH PŘÍLOHY

	Strana
B.1. Akutní toxicita orální (per os) .....	7827
B.1. bis Akutní toxicita orální (per os) - metoda fixní dávky .....	7831
B.1. tris Akutní toxicita (orální) - metoda stanovení třídy akutní toxicity .....	7836
B.2. Akutní toxicita (inhalační) .....	7850
B.3. Akutní toxicita (dermální) .....	7854
B.4. Akutní toxicita (kožní dráždivost) .....	7858
B.5. Akutní toxicita (oční dráždivost) .....	7862
B.6. Senzibilizace kůže .....	7867
B.7. Subakutní toxicita orální (28denní opakovaná aplikace) .....	7875
B.8. Subakutní toxicita inhalační (28denní opakovaná aplikace) .....	7881
B.9. Subakutní toxicita dermální (28denní opakovaná dávka) .....	7886
B.10. Mutagenita ( <i>in vitro</i> cytogenetický test na savčích buňkách) .....	7890
B.11. Mutagenita ( <i>in vivo</i> cytogenetická analýza chromosomů kostní dřeně savců) .....	7893
B.12. Mutagenita (micronukleus test) .....	7896
B.13. Mutagenita ( <i>Escherichia coli</i> - test zpětné mutace) .....	7899
B.14. Mutagenita ( <i>Salmonella typhimurium</i> - test zpětné mutace) .....	7902
B.15. Genové mutace - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7905
B.16. Mitotická rekombinace - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7908
B.17. <i>In vitro</i> test na genové mutace v savčích buňkách .....	7911
B.18. Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňky <i>in vitro</i> .....	7914
B.19. SCE - výměna sesterských chromatid <i>in vitro</i> .....	7918
B.20. Recessivní letální mutace vázané na pohlaví u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7921
B.21. Test transformace savčích buněk <i>in vitro</i> .....	7924
B.22. Dominantní letální test u hlodavců .....	7927
B.23. Cytogenetická analýza savčích zárodečných buněk <i>in vivo</i> .....	7930

	Strana
B.24. Spot test u myši .....	7933
B.25. Přenosné translokace u myši .....	7936
B.26. Subchronická toxicita orální (90denní opakované podávání per os, studie na hlodavcích) .....	7940
B.27. Subchronická toxicita orální (90denní opakované podávání per os, studie na nehlodavcích) .....	7944
B.28. Subchronická toxicita dermální (90denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích) .....	7948
B.29. Subchronická toxicita inhalační (90denní opakovaná inhalační expozice, studie na hlodavcích) .....	7953
B.30. Testování chronické toxicity .....	7958
B.31. Studie teratogenity - hlodavci a nehlodavci .....	7964
B.32. Test karcinogenity .....	7967
B.33. Kombinovaný test chronické toxicity/karcinogenity .....	7973
B.34. Reprodukční toxicita - jednogenerační test .....	7981
B.35. Reprodukční toxicita - dvougenerační test .....	7985
B.36. Toxikokinetika .....	7989
B.37. Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu - akutní expozice .....	7993
B.38. Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu - 28denní opakovaná expozice .....	7998







**Vydává a tiskne:** Tiskárna Ministerstva vnitra, p. o., Bartůňkova 4, pošt. schr. 10, 149 01 Praha 415, telefon (02) 792 70 11, fax (02) 795 26 03 – **Redakce:** Ministerstvo vnitra, Nad Štolou 3, pošt. schr. 21/SB, 170 34 Praha 7-Holešovice, telefon: (02) 614 32341 a 614 33502, fax (02) 614 33502 – **Administrace:** písemné objednávky předplatného, změny adres a počtu odebraných výtisků – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon 0627/305 161, fax: 0627/321 417. Objednávky ve Slovenské republice přijímá a titul distribuuje Magnet-Press Slovakia, s. r. o., Teslova 12, 821 02 Bratislava, tel./fax: 00421 7 525 46 28, 525 45 59. **Roční předplatné** se stanovuje za dodávku kompletního ročníku včetně rejstříku a je od předplatitelů vybíráno formou záloh ve výši oznámené ve Sbírce zákonů. Závěrečné vyúčtování se provádí po dodání kompletního ročníku na základě počtu skutečně vydaných částek (první záloha činí 2300,- Kč) – Vychází podle potřeby – **Distribuce:** celoroční předplatné i objednávky jednotlivých částek – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon: 0627/305 179, 305 153, fax: 0627/321 417. – **Drobný prodej** – **Benešov:** HAAGER – Potřeby školní a kancelářské, Masarykovo nám. 101; **Bohumín:** ŽDB, a. s., technická knihovna, Bezručova 300; **Brno:** GARANCE-Q, Koliště 39, Knihkupectví ČS, Kapucínské nám. 11, Knihkupectví M. Ženíška, Květinářská 1, M.C.DES, Cejl 76, SEVT, a. s., Česká 14; **České Budějovice:** Prospektrum, Kněžská 18, SEVT, a. s., Krajinská 38; **Hradec Králové:** TECHNOR, Hořícká 405; **Chomutov:** DDD Knihkupectví - Antikvariát, Ruská 85; **Jihlava:** VIKOSPOL, Smetanova 2; **Kadaň:** Knihařství – Příbíkova, J. Švermy 14; **Kladno:** eL VaN, Ke Stadionu 1953; **Klatovy:** Krameriovo knihkupectví, Klatovy 169/I.; **Kolín 1:** Knihkupectví U Kašků, Karlovo nám. 46; **Liberec:** Podještědské knihkupectví, Moskevská 28; **Most:** Knihkupectví Růžička, Šeříková 529/1057; **Olomouc:** BONUM, Ostružnická 10, Tycho, Ostružnická 3; **Ostrava:** LIBREX, Nádražní 14, Profesio, Hollarova 14, SEVT, a. s., Dr. Šmerala 27; **Pardubice:** LEJHANEČ, s. r. o., Sladkovského 414; **Plzeň:** ADMINA, Úslavská 2, EDICUM, Vojanova 45, Technické normy, Lábkova pav. č. 5; **Praha 1:** FIŠER-KLEMENTINUM, Karlova 1, LINDE Praha, a. s., Opletalova 35, NADATUR, Hyberská 5, PROSPEKTRUM, Na Poříčí 7; **Praha 4:** Abonentní tiskový servis, Zdiměřická 1446/9, PROSPEKTRUM, Nákupní centrum, Budějovická, SEVT, a. s., Jihlavská 405; **Praha 5:** SEVT, a. s., E. Peškové 14; **Praha 6:** PPP – Staňková Isabela, Verdunská 1; **Praha 8:** JASIPA, Zenklova 60; **Praha 10:** BMSS START, areál VÚ JAWA, V Korytech 20; **Přerov:** Knihkupectví EM-ZET, Bartošova 9; **Příbram:** VEMA, Korecká Blanka, Čechovská 138; **Sokolov:** Arbor Sokolov, a. s., Nádražní 365; **Šumperk:** Knihkupectví D-G, Hlavní tř. 23; **Teplice:** L + N knihkupectví, Kapelní 4; **Trutnov:** Galerie ALFA, Bulharská 58; **Ústí nad Labem:** 7 RX, s. r. o., Mírová 4, tel.: 047/44 249, 44 252, 44 253; **Zábřeh:** Knihkupectví PATKA, Žižkova 45; **Zlín-Louky:** INFOSERVIS, areál Telekomunikačních montáží; **Zlín-Malenovice:** Ing. M. Kučeřík, areál HESPO; **Znojmo:** Knihkupectví Houdková, Divišovo nám. 12; **Žatec:** Prodejna U Pivovaru, Žižkovo nám. 76. **Distribuční podmínky předplatného:** jednotlivé částky jsou expedovány neprodleně po dodání z tiskárny. Objednávky nového předplatného jsou vřizovány do 15 dnů a pravidelné dodávky jsou zahajovány od nejbližší částky po ověření úhrady předplatného nebo jeho zálohy. Částky vyšlé v době od zaevidování předplatného do jeho úhrady jsou doposílány jednorázově. Změny adres a počtu odebíraných výtisků jsou prováděny do 15 dnů. **Reklamacce:** informace na tel. čísle 0627/305 168. V písemném styku vždy uvádějte IČO (právnícká osoba), rodné číslo (fyzická osoba). **Podávání novinových zásilek** povoleno Českou poštou, s. p., Odštěpný závod Jižní Morava Ředitelství v Brně č. j. P/2-4463/95 ze dne 8. 11. 1995.