32000L0032

SMERNICA KOMISIE 2000/32/ES
z 19. mája 2000,
ktorou sa prispôsobuje technickému pokroku po 26. krát smernica Rady č. 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok (*)
(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady č. 67/548/EHS z 27. júna 1967 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok [1], naposledy zmenenú a doplnenú smernicou Európskeho parlamentu a Rady č. 1999/33/EC [2], najmä na jej článok 28,

keďže:

(1) Príloha I smernice č. 67/548/EHS obsahuje zoznam nebezpečných látok spolu s podrobnosťami o klasifikácii a označovaní každej látky; súčasné vedecké a technické poznatky ukázali, že zoznam nebezpečných látok v tejto prílohe by sa mal prispôsobiť; niektoré jazykové verzie smernice vyžadujú opravy v konkrétnych častiach predslovu a tabuľky A prílohy I.

(2) Príloha III smernice č. 67/548/EHS obsahuje zoznam výrazov označujúcich povahu špecifických rizík nebezpečných látok a prípravkov. Príloha IV smernice č. 67/548/EHS obsahuje zoznam výrazov označujúcich rady v oblasti bezpečnosti týkajúcej sa nebezpečných látok a prípravkov. Príloha VI smernice č. 67/548/EHS obsahuje návod ku klasifikácii a označovaniu nebezpečných látok a prípravkov; niektoré jazykové verzie smernice vyžadujú opravy v konkrétnych častiach príloh III, IV a VI.

(3) Príloha V smernice č. 67/548/EHS ustanovuje metódy pre stanovenie chemicko-fyzikálnych vlastností, toxicity a ekotoxicity látok a prípravkov; túto prílohu je potrebné prispôsobiť technickému pokroku.

(4) Príloha IX smernice č. 67/548/EHS obsahuje ustanovenia týkajúce sa detských uzáverov. Tieto ustanovenia by sa mali prispôsobiť a aktualizovať; je potrebné rozšíriť rozsah použitia detských uzáverov.

(5) Opatrenia v tejto direktíve sú v súlade s názorom Výboru o prispôsobení technickému pokroku smerníc pre odstránenie technických prekážok obchodu s nebezpečnými látkami a prípravkami,

PRIJALA TÚTO SMERNICU

Článok 1

Smernica č. 67/548/EHS sa mení a dopĺňa takto:

1. Príloha I sa mení a dopĺňa takto:

   a) poznámka Q v prílohe 1A tejto smernice nahrádza príslušnú poznámku v predslove;

   b) riadky v prílohe 1B tejto smernice nahrádzajú príslušné riadky v tabuľke A;

   c) položky v prílohe 1C tejto smernice nahrádzajú príslušné položky;

   d) vkladajú sa položky v prílohe 1D tejto smernice.

2. Výraz o riziku v prílohe 2 tejto smernice nahrádza príslušný výraz v prílohe III.

3. Príloha IV sa mení a dopĺňa nasledovne:

   a) výrazy o bezpečnosti v prílohe 3A tejto smernice nahrádzajú príslušné výrazy v prílohe IV;

(*) Prijaté pred 27. prispôsobením.
(1) Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1.
(2) Ú. v. ES L 199, 30.7.1999, s. 57.

b) výrazy o kombinovanej bezpečnosti v prílohe 3B tejto smernice nahrádzajú príslušné výrazy v prílohe IV.

4. Časť B prílohy V sa mení a dopĺňa nasledovne:

a) text v prílohe 4A tejto smernice nahrádza kapitolu B.10;

b) text v prílohe 4B tejto smernice nahrádza kapitolu B.11;

c) text v prílohe 4C tejto smernice nahrádza kapitolu B.12;

d) text v prílohe 4D tejto smernice nahrádza kapitoly B.13 a B.14;

e) text v prílohe 4E tejto smernice nahrádza kapitolu B.17;

f) text v prílohe 4F tejto smernice nahrádza kapitolu B.23, preto sa mení nadpis kapitoly 23 vo vysvetlivke;

g) pridáva sa text v prílohe 4G tejto smernice.

5. Vypúšťa sa štvrtá zarážka všeobecného úvodu časti C prílohy V.

6. Texty v prílohe 5 tejto smernice nahrádzajú príslušné texty v prílohe VI.

7. Príloha IX sa mení a dopĺňa podľa prílohy 6 tejto smernice.

Článok 2

1. Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosianutie súladu s touto smernicou najneskôr do 1. júna 2001. Bezodkladne o tom informujú Komisiu.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu. Členské štáty určia spôsob uvedenia takéhoto odkazu.

2. Členské štáty oznámia Komisii znenie hlavných ustanovení vnútroštátnych právnych predpisov, ktoré prijmú v oblasti pôsobnosti tejto smernice a korelačnú tabuľku, ktorá ukazuje ako sa ustanovenia tejto smernice zhodujú s prijatými vnútroštátnymi ustanoveniami.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť v tretí deň po jej uverejnení v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 19. mája 2000

Za Komisiu

Margot WALLSTRÖM

členka Komisie

PRÍLOHA 1A

PREDSLOV K PRÍLOHE I

Vysvetlivky k poznámkam týkajúcim sa identifikácie, klasifikácie a označovania látok

DA:

Poznámka Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

— en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage

— en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage

— en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller

— en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Poznámka Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar

— ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet

— frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Netýka sa ES verzie)

(Netýka sa DE verzie)

(Netýka sa EL verzie)

(Netýka sa EN verzie)

(Netýka sa FR verzie)

(Netýka sa IT verzie)

(Netýka sa NL verzie)

(Netýka sa PT verzie)

(Netýka sa FI verzie)

PRÍLOHA 1B

„TABULKA A

Z	Symbol	Es	Da	De	El	En	Fi	Fr	It	Nl	Pt	Sv
18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon
64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίνιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadolínio	Gadolinium“

PRÍLOHA 1C

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
006–011–00–7	karbaryl (ISO) 1-naftyl-N-metylkarbamidan		200–555–0	63–25–2	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22–40–50 S: (2-)22–24–36/37–46–61		
006–013–00–8	metham-sodium (ISO) methylditiokarbamidan sodný		205–293–0	137–42–8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50–53	C; N R: 22–31–34–43–50/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–60–61		
006–015–00–9	diuron (ISO) 3-(3,4-dichlórfenyl)- 1,1-dimethylmočovina		206–354–4	330–54–1	Karc. kat. 3; R40 Muta. kat. 3; R40 Xn; R22–48/22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–48/22–50/53 S: (2-)13–22–23–37–46–60–61		
006–016–00–4	propoxur (ISO) 2-izopropoxyfenyl-*N*-methylkarbamidan		204–043–8	114–26–1	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–017–00-X	aldikarb (ISO) 2-methyl-2-(metyltio)propanal-O-(N-methylkarbamoyl)oxym		204–123–2	116–06–3	T+; R26/28 T; R24 N; R50–53	T+; N R: 24–26/28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–018–00–5	aminokarb (ISO) 4-(dimethylamino)-3-tolyl methylkarbamidan		217–990–7	2032–59–9	T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
006–019–00–0	di-allát (ISO) S-(2,3-dichlórallyl)-N,N-diizopropylthiokarbamidan		218–961–1	2303–16–4	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)25–36/37–60–61		
006–020–00–6	barban (ISO) 4-chlorbut-2-yn-1-yl-N-(3-chlorfenyl)karbamidan		202–930–4	101–27–9	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–36/37–60–61		
006–023–00–2	merkaptodimethur (ISO) methiokarb 3,5-dimethyl-4-(methylsulfanyl)fenyl-N-methylkarbamidan		217–991–2	2032–65–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)22–37–45–60–61		
006–024–00–8	proxan-sodium (ISO) O-izopropylditiokarbamidan sodný		205–443–5	140–93–2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51–53	Xn; N R: 22–38–51/53 S: (2-)13-61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
006–026–00–9	karbofuran (ISO) 2,3- dihydro-2,2dimethylbenzofuran-7-yl N-methylkarbamidan		216–353–0	1563–66–2	T+; R26/28 N; R50–53	T+; N R: 26/28–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–028–00-X	dinobuton (ISO) 2-(1-methylpropyl)-4,6-dinitrofenyl-izopropyl uhličitan		213–546–1	973–21–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–029–00–5	dioxacarb (ISO) 2-(1,3-dioxolan-2-yl)fenyl-N-methylkarbamidan		230–253–4	6988–21–2	T; R25 N; R51–53	T; N R: 25–51/53 S: (1/2-)37–45–61		
006–033–00–7	metoxuron (ISO) 3-(3-chlór-4-methoxyfenyl)-1,1-dimethylmočovina		243–433–2	19937–59–8	N; R50–53	N R: 5 0/ 5 3 S: 60-61		
006–034–00–2	pebulát (ISO) N-butyl-N-etyl-S-propyltiokarbammidan		214–215–4	1114–71–2	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)23-61		
006–035–00–8	pirimikarb (ISO) 5,6-dimethyl-2-dimetylamino- pyrimidin-4-yl-N, N-dimethylkarbamidan		245–430–1	23103–98–2	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2)22–37–45–60–61		
006–037–00–9	promekarb (ISO) 3-izopropyl-5-metylfenyl-N-metylkarbamidan		220–113–0	2631–37–0	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)24–37–45–60–61		
006–038–00–4	sulfallát (ISO) 2-chlorallyl-N, N-dimetylditiokarbamidan	E	202–388–9	95–06–7	Karc. kat. 2; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61		
006–039–00-X	tri-allát (ISO) S-(2,3,3-trichlóralyl diizopropylthiokarbamidan		218–962–7	2303–17–5	Xn; R22–48/22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–48/22–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
006–042–00–6	monuron (ISO) 3-(4-chlórfenyl)- 1,1-dimetylmočovina		205–766–1	150–68–5	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–043–00–1	monuron-TCA 3-(4-chlórfenyl)- 1,1-dimetyluronium-trichlóroctan		—	140–41–0	Xi; R36/38 Karc. kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 36/38–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
006–045–00–2	methomyl (ISO) 1-(metyltio)etylideneneamino N-metylkarbamidan		240–815–0	16752–77–5	T+; R28 N; R50–53	T+; N R: 28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–046–00–8	bendiokarb (ISO) 2,2-dimetyl-1,3-benzodioxol-4-yl-N-metylkarbamidan		245–216–8	22781–23–3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50–53	T; N R: 21–23/25–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–047–00–3	bufenkarb (ISO) zmes: 3-(1-metylbutyl)fenyl-N-metylkarbamidanu a 3-(1-etylpropyl)fenyl-N-metylkarbamidanu		—	8065–36–9	T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
006–048–00–9	ethiofenkarb (ISO) 2-(etyltiometyl)fenyl-N-metylkarbamidan		249–981–9	29973–13–5	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
006–050–00-X	fenuron-TCA 1,1-dimetylenyl-3-fenyluronium-trichlóroctan		—	4482–55–7	Xi; R38 N; R50–53	Xi; N R: 38–50/53 S: (2-)60-61		
006–053–00–6	isoprokarb (ISO) 2-izopropylfenyl-N-metylkarbamidan		220–114–6	2631–40–5	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
006–054–00–1	mexakarbát (ISO) 3,5-dimetylam-4-dimetylaminofenyl-N-metylkarbamidan		206–249–3	315–18–4	T+; R28 Xn; R21 N; R50–53	T+; N R: 21–28–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–057–00–8	nitrapyrin (ISO) 2-chloro-6-trichlórmetylpyridín		217–682–2	1929–82–4	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)24-61		
006–060–00–4	oxykarboxin (ISO) 2-metyl-4,4-dioxo-5,6-dihydro-4λ^4-1,4-oxathiin-3-karboxanilid		226–066–2	5259–88–1	Xn; R22 R52–53	Xn R:22–52/53 S: (2-)61		
006–069–00–3	thiofanát-metyl (ISO) 1,2-di[3-(methoxykarbonyl2-tioureido)benzén		245–740–7	23564–05–8	Muta. kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–070–00–9	furmecyklox N-cyklohexyl-N-methoxy-2,5-dimetyl-3-furamid		262–302–0	60568–05–0	Karc. kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
006–088–00–7	benfurakarb (ISO) etyl N-[2,3-dihydro-2,2-dimetylbenzofurán-7-yloxykarbonyl(metyl)aminotio]- N-izopropyl-beta-alaninát		—	82560–54–1	T; R23/25 N; R50–53	T; N R: 23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
007–012–00–5	N, N-dimetylhydrazín 1,1-dimetylhydrazin	E	200–316–0	57–14–7	F; R11 Karc. kat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51–53	F; T; N R: 45–11–23/25–34–51/53 S: 53–45–61		
007–013–00–0	N, N-dimetylhydrazín 1,2-dimetylhydrazín	E	—	540–73–8	Karc. kat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51–53	T; N R: 45–23/24/25–51/53 S: 53–45–61	C ≥ 25 %: T; R45–23/24/25 3 % < C < 25 %: T; R45–20/21/22 0,01 % < C < 3 %: T; R45	
009–003–00–1	kyselina fluorovodíková… %	B	231–634–8	7664–39–3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28–35 S: (1/2-)7/9–26–36/37–45	C ≥ 7 %: T+; C; R26/27/28–35 1 % ≤ C < 7 %: T; R23/24/25–34 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn;R20/21/22–36/37/38	
015–039–00–9	azinfos-metyl (ISO) O, O-dimetyl 4-oxobenzotriazín-3-ylmetyl fosforoditioát		201–676–1	86–50–0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50–53	T+; N R: 24–26/28–43–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–048–00–8	fenthion (ISO) O, O-dimetyl-O-(4-(metyltio-m-tolyl)fosforothioát		200–231–9	55–38–9	Muta. kat. 3; R40 T; R23–48/25 Xn; R21/22 N; R50–53	T; N R: 21/22–23–40–48/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
015–056–00–1	azinfos-ethyl (ISO) O, O-dietyl 4-oxobenzotriazín-3-ylmetyl fosforditioát		220–147–6	2642–71–9	T+; R28 T; R24 N; R50–53	T+; N R: 24–28–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–140–00–8	triazofos (ISO) O, O-dietyl-O-1-fenyl-1H, 2,4-triazol-3-ylfosfortioát		245–986–5	24017–47–8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50–53	T; N R: 21–23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
016–013–00-X	chlorid sirnatý		234–129–0	10545–99–0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14–34–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
016–014–00–5	chlorid siričitý		—	13451–08–6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14–34–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
016–023–00–4	dimetylsulfát	E	201–058–1	77–78–1	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45–25–26–34–43 S: 53-4 5	C ≥ 25 %: T+; R45–25–26–34–43 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45–22–26–34–43 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45–22–26–36/37/38–43 5 % ≤ C < 7 %: T; R45–22–23–36/37/38–43 3 % ≤ C < 5 %: T; R45–22–23–43 1 % ≤ C < 3 %: T; R45–23–43 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45–20 0,01 % ≤ C < 0,1 %:T; R45	
016–024–00-X	dimexano (ISO) bis(methoxythiokarbonyl)disulfid		215–993–8	1468–37–7	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
016–071–00–6	trisodium-3-amino-6,13-dichlór-10-((3-((4-chlór-6-(2-sulfofenylamino)-1,3,5-triazín-2-yl)amino)propyl)amino)-4,11- trifenoxydioxazín sulfonát		410–130–3	136248–03–8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
022–001–00–5	chlorid titaničitý		231–441–9	7550–45–0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-)7/8–26–36/37/39–45	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
030–004–00–8	dimetylzinok [1] diethylzinok [2]		208–884–1 [1] 209–161–3 [2]	544–97–8 [1] 557–20–0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50–53	F; C; N R: 14–17–34–50/53 S: (1/2-)16–43–45–60–61		
050–002–00–0	cyhexatin (ISO) hydroxytricyklohexylcíničitan chlorid tri(cyklohexyl)cíničitý		236–049–1	13121–70–5	Xn; R20/21/22 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–50/53 S: (2-)13–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
050–012–00–5	tetracyklohexylcíničitan [1] chlórtricyklohexylcíničitan [2] butyltricyklohexylcíničitan [3]		215–910–5 [1] 221–437–5 [2] 230–358–5 [3]	1449–55–4 [1] 3091–32–5 [2] 7067–44–9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–50/53 S: (2-)26–28–60–61	C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22	1
050–017–00–2	fenbutatin oxid (ISO) bis(tris(2-metyl-2-fenylpropyl)cín)oxid		236–407–7	13356–08–6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26–36/38–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
082–009–00-X	olovnatá sulfochromátová žltá CI C. I pigment yellow (Táto látka je identifikovaná v indexe farieb (Color Index) číslom Colour Index Constitution Number, C. I. 77603)		215–693–7	1344–37–2	Karc. kat. 3; R40 Repr. kat. 1; R61 Repr. kat. 3; R62 R33 N; R50–53	T; N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
082–010–00–5	olovnatá chromátová molybdátová sulfátová červeň C. I Pigment Red 104 (Táto látka je identifikovaná v indexe farieb (Color Index) číslom Colour Index Constitution Number, C. I. 77605)		235–759–9	12656–85–8	Karc. kat. 3; R40 Repr. kat. 1; R61 Repr. kat. 3; R62 R33 N; R50–53	T; N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
601–024–00-X	kumén [1] propylbenzén [2]		202–704–5 [1] 203–132–9 [2]	98–82–8 [1] 103–65–1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51–53	Xn; N R: 10–37–51/53–65 S: (2-)24–37–61–62		4
601–032–00–3	benzo[a]pyren benzo[def]chrysén		200–028–5	50–32–8	Karc. kat.2; R45 Muta. kat. 2; R46 Repr. kat. 2; R60–61 N; R50–53	T; N R: 45–46–60–61–50/53 S: 53–45–60–61		
601–034–00–4	benzo[e]acefenanthrylén		205–911–9	205–99–2	Karc. kat.2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
602–035–00–2	1,4-dichlórbenzén p-dichlórbenzén		203–400–5	106–46–7	Xi; R36 N; R50–53	Xi; N R: 36–50/53 S: (2-)24/25–46–60–61		
602–054–00–6	3-jódpropén allyl jodid		209–130–4	556–56–9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7–26–45		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
603–076–00–9	but-2-ín-1,4-diol 2-butín-1,4-diol		203–788–6	110–65–6	T; R23/25 Xn; R21–48/22 C; R34	T R: 21–23/25–34–48/22 S: (1/2-)26–36/37/39–45	C ≥ 50 %: T; R21–23/25–34–48/22 25 % ≤ C < 50 %: T; R21–23/25–36/38–48/22 10 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22–48/22 3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22	
603–091–00–0	exo-1-metyl-4-(1-metyletyl)-7-oxabi-cyklo[2.2.1]heptan-2-ol		402–470–6	87172–89–2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8–22–36 S: (2-)26		
603–093–00–1	exo-1-metyl-4-(1-metyletyl)-7-oxabi-metylbenzyl)oxy]-7-oxabicyklo[2.2.1]heptan		402–410–9	87818–31–3	Xn; R20 N; R51–53	Xn; N R: 20–51/53 S: (2-)23-61		
603–097–00–3	1,1′, 1″-nitrilotripropan-2-ol triizopropanolamín		204–528–4	122–20–3	Xi; R36 R52–53	Xi R:36–52/53 S: (2-)26-61		
603–117–00–0	propan-2-ol izopropylalkohol izopropanol		200–661–7	67–63–0	F; Rll Xi; R36 R67	F; Xi R: 11–36–67 S: (2-)7–16–24/25–26		6
604–020–00–6	bifenyl-2-ol 2-hydroxybifenyl 2-fenylfenol (ISO)		201–993–5	90–43–7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38–50 S: (2-)22-61		
604–021–00–1	2-fenylfenol, sodná soľ 2-bifenylát sodný		205–055–6	132–27–4	Xn; R22 Xi; R37/38–41 N; R50	Xn; N R: 37/38–41–50 S: (2-)22–26–61		
604–024–00–8	4,4'-izobutyletylidenedifenol (alt.): 2,2-bis(4'hydroxyfenyl)-4-metylpentán		401–720–1	6807–17–6	Repr. kat. 2; R60 Xi; R36 N; R50–53	T; N R: 60–36–50/53 S: 53–45–60–61		
604–041–00–0	acifluorfen [1] acifluorfen-sodík [2] 5-[2-chlór-4-(trifluormetyl)fenoxy]-2-nitrobenzoová kyselina [1] sodík-5-[2-chlór-4-trifluormetyl)fenoxy]-2-nitrobenzoan [2]		256–634–5 [1] 263–560–7 [2]	50594–66–6 [1] 62476–59–9 [2]	Xn; R22 Xi; R38–41 N; R50–53	Xn; N R: 22–38–41–50/53 S: (2-)24–39–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
604–043–00–1	monobenzon 4-hydroxyfenyl benzyl éter hydrochinon monobenzyl éter		203–083–3	103–16–2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25–26–37		
604–044–00–7	mechinol 4-methoxyfenol hydrochinon monometyl éter		205–769–8	150–76–5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22–36–43 S: (2-)24/25–26–37/39–46		
605–016–00–7	glyoxal… % ethandial… %	B	203–474–9	107–22–2	Muta. kat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20–36/38–40–43 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20–36/38–40–43 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40–43	
606–016–00-X	pindon (ISO) 2-pivaloylindan-1,3-dion		201–462–8	83–26–1	T; R25–48/25 N; R50–53	T; N R: 25–48/25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
606–018–00–0	dichlon (ISO) 2,3-dichlór-1,4-naftochinon		204–210–5	117–80–6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50–53	Xn; N R: 22–36/38–50/53 S: (2-)26–60–61		
606–019–00–6	chlórdekon (ISO) perchlórpentacyklo[5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}] dekan-5-on dekachlórpentacyklo[5.2.1.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{5,8}] dekan-4-on		205–601–3	143–50–0	Karc. kat. 3; R40 T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–40–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
606–034–00–8	metribuzin (ISO) 4-amino-6-tert-butyl-3-metyltio-1,2,4-triazín-5(4H-on 4-amino-4,5-dihydro-6-(1,1-dimetyletyl)-3-metyltio-1,2,4-triazín-5-on		244–209–7	21087–64–9	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
606–035–00–3	chlóridazon (ISO) 5-amino-4-chlór-2-fenylpyridazín-3(2H)-on pyrazon		216–920–2	1698–60–8	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
606–036–00–9	chinomethionát chinomethionát (ISO) 6-metyl-1,3-ditiolo(4,5-b)chinoxalin-2-on		219–455–3	2439–01–2	Repr. kat. 3; R62 Xn; R20/21/22–48/22 Xi; R36 R43 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–36–43–48/22–50/53–62 S: (2-)24–37–60–61		
606–037–00–4	triadimefon (ISO) 1-(4-chlórfenoxy)-3,3-dimetyl-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butanon		256–103–8	43121–43–3	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
606–044–00–2	2,4,6-trimetylbenzofenon		403–150–9	954–16–5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50–53	Xn; N R: 22–36–50/53 S: (2-)26–60–61		
607–043–00-X	dicamba (ISO) 2,5-dichlór-6-metoxybenzoová kyselina (kyselina) 3,6-dichlór-2-methoxybenzoová kyselina		217–635–6	1918–00–9	Xn; R22 Xi; R41 R52–53	Xn; N R: 22–41–52/53 S: (2-)26-61		
607–057–00–6	kumachlór (ISO) 3-[1-(4-chlórfenyl)-3-oxobutyl]-4-hydroxykumarín		201–378–1	81–82–3	Xn; R48/22 R52–53	Xn R:48/22–52/53 S: (2-)37-61		
607–058–00–1	kumafuryl (ISO) fumarín (RS)-3-[1-(2-furyl)-3-oxobutyl)]-4-hydroxykumarín 4-hydroxy-3-[3-oxo-1-(2-furyl)butyl]kumarín		204–195–5	117–52–2	T; R25–48/25 R52–53	T R:25–48/25–52/53 S: (1/2-)37–45–61		
607–079–00–6	kelevan (ISO) etyl-5-(perchlór-5-hydroxypentacyklo[5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]dekan-5-yl)pentanoát ethyl-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-dekachlór-4-hydroxypentacyklo[5.2.1.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{5,8}]dekan-4-yl)-4- oxovaleran		—	4234–79–1	T; R24 Xn; R22 N; R51–53	T; N R: 22–24–51/53 S: (1/2-)36/37–45–61		
607–097–00–4	1,2-anhydrid kyseliny benzén-1,2,4-trikarboxylovejanhydrid trimellitu		209–008–0	552–30–7	Xi; R37–41 R42/43	Xn R: 37–41–42/43 S: (2-)22–26–36/37/39		
607–143–00–3	kyselina valerová (kyselina pentanová)		203–677–2	109–52–4	C; R34 R52–53	C R:34–52/53 S: (1/2-)26–36–45–61		
607–152–00–2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-trichlórbenzoová kyselina		200–026–4	50–31–7	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)61		
607–153–00–8	benazolin (ISO) kyselina 4-chlór-2,3-dihydro-2-oxo-1,3-benzotiazol-3-yloctová (kyselina)		223–297–0	3813–05–6	Xi; R36/38 R52–53	Xi R:36/38–52/53 S: (2-)22-61		
607–156–00–4	chlórfenson (ISO) 4-chlororfenyl-4-chlorobenzénsulfonát		201–270–4	80–33–1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50–53	Xn; N R: 22–38–50/53 S: (2-)37–60–61		
607–158–00–5	sodná soľ kyseliny chlóroctovej chlóroctan sodný		223–498–3	3926–62–3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25–38–50 S: (1/2-)22–37–45–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–159–00–0	chlorobenzilát (ISO) ethyl-2,2-bis(4-chlórfenyl)-2-hydroxyoctan ethyl-4,4'-dichlórbenzilát		208–110–2	510–15–6	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
607–176–00–3	zmes: alfa-3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)- 5-tert-butyl-4hydroxyfenyl)propionyl-ω-hydroxypoly(oxyethylénu); α-3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyfenyl)propionyl-ω-3-(3–2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl4-hydroxyfenyl)propionyloxypoly(oxyetylénu)		400–830–7	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)36/37–61		
607–188–00–9	hydrid sodný N-karboxylátoetyl-N-oktadek-9-enylmaleamát		402–970–4	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24/37–61		
607–209–00–1	zmes: O, O-di(1-metyletyl)tritio-bis-tiomravčanu; O, O-di(1-metyletyl)tetratio-bis-tiomravčanu; O, O-di(1-metyletyl)pentatio-bis- tiomravčanu		403–030–6	—	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/ 53 S: (2-)36/37–60–61		
607–213–00–3	ethyl-3,3-bis[(1,1-dimetylpropyl)peroxy] maslan		403–320–2	67567–23–1	E; R2 O; R7 R10 N; R51–53	E; N R: 2–7–10–51/53 S: (2-)3/7–14–33–36/37/39–61		
607–217–00–5	2-etoxyetyl-2-[4-(2,6-dihydro-2,6-dioxo-7-fenyl-1,5-dioxaindacen-3-yl)fenoxy]octan		403–960–2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24–37–61		
607–243–00–7	3,6-dichlór-o-anízan sodný [1] kyselina 3,6-dichlór-o-anízová (kyselina), zlúčenina s 2,2'-iminodietanolom (1:1) [2] kyselina 3,6-dichlór-o-anízová (kyselina), zlúčenina s2-aminoetanolom (1:1) [3]		217–846–3 [1] 246–590–5 [2] 258–527–9 [3]	1982–69–0 [1] 25059–78–3 [2] 53404–28–7 [3]	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–248–00–4	Naftalam sodný N-naphth-1-ylphtalamát sodný		205–073–4	132–67–2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–249–00-X	(1-metyl-1-2-etándiyl)bis[oxy(metyl-2-1- etán-diyl) diakrylát tripropylénglykol diakrylát TPGDA		256–032–2	42978–66–5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51–53	Xi; N R:36/37/38–43–51/53 S: (2-)24–37–61	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38–43 1 % ≤ C < 10 %: Xi; R43	
607–252–00–6	lambda-cyhalothrin (ISO) zmes (1:1): (S)-alfa-kyano-3-fenoxybenzyl (Z)-(1R)-cis-3-(2-chlór-3,3,3-trifluoropropenyl)– 2,2-dimetylcyklopropán karboxylátu a(r)-alfa-kyano-3-fenoxybenzyl (Z)-(1S)-cis–3-(2-chlór-3,3,3-trifluoropropenyl)– 2,2-dimetylcyklopropánkarboxylátu		415–130–7	91465–08–6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50–53	T+; N R: 21–25–26–50/53 S: (1/2-) 28–36/37/39–38–45–60–61		
607–255–00–2	fluroxypyr (ISO) kyselina 4-amino-3,5-dichlór-6-fluoro-2-pyridyloxyoctová (kyselina)		—	69377–81–7	R52–53	R: 52/53 S: 61		
608–003–00–4	akrylonitril	D E	203–466–5	107–13–1	F; Rll Karc. kat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38–41 R43 N; R51–53	F; T; N R: 45–11–23-/24/25–37/38–41–43–51/53 S: 9–16–53–45–61	C ≥ 20 %: T; R45–23/24/25–37/38–41–43 10 % ≤ C < 20 %: T; R45–23/24/25–41–43 5 % ≤ C < 10 %: T; R45–23/24/25–36–43 1 % ≤ C < 5 %:T; R45–23/24/25–43 0,2 % ≤ C < 1 %:T;R45–20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45	
608–016–00–5	1,4-dikyano-2,3,5,6-tetra-chlórbenzén		401–550–8	1897–41–2	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
609–030–00–4	dinoterb (ISO) 2-tert-butyl-4,6-dinitrofenol	E	215–813–8	1420–07–1	Repr. kat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50–53	T+; N R: 61–24–28–44–50/53 S: 53–45–60–61		
609–040–00–9	nitrofen (ISO) (2,4-dichlórfenyl)(4-nitrofenyl) éter	E	217–406–0	1836–75–5	Karc. kat. 2; R45 Repr. kat. 2; R61 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–61–22–50/53 S: 53–45–60–61		
609–044–00–0	teknazen (ISO) 1,2,4,5-tetrachlór-3-nitrobenzén		204–178–2	117–18–0	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
611–008–00–4	4-aminoazobenzén 4-fenylazoanilín		200–453–6	60–09–3	Karc. kat. 2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
611–013–00–1	trilítium 1-hydroxy-7-(3-sulfonátoanilino2-(3-metyl-4-(2-metoxy-4 (3-sulfonátofenylazo)fenylazo)fenylazo naphtalén-3-sulfonát		403–650–7	117409–78–6	E; R2 N; R51–53	E; N R: 2–51/53 S: (2-)35-61		
611–031–00-X	4,4'-[(4-iminocyklohexa-2,5-dienylidenmetylen)dianilin-hydrochlorid C. I Basic Red 9		209–321–2	569–61–9	Karc. kat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612–035–00–4	2-methoxyanilin o-anisidin	E	201–963–1	90–04–0	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45–23/24/25 S: 53-45		
612–042–00–2	benzidín 1,1'-bifenyl-4,4'-diamin 4,4'-diaminobifenyl bifenyl-4,4'- yléndiamín	E	202–199–1	92–87–5	Karc. kat. 1; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61	C ≥ 25 %: T; R45–22 0,01 % ≤ C < 25 %: T; R45	
612–051–00–1	4,4'-diaminodifenylmetán 4,4'-metyléndianilín	E	202–974–4	101–77–9	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51–53	T; N R: 45–39/23/24/25–43–48/20/21/22–51/53 S:53–45–61		
612–081–00–5	soli 4,4'-bi-o-toluidínu soli 3,3'-dimetylbenzidínu soli o-tolidínu	A E	210–322–5 265–294–7 277–985–0	612–82–8 64969–36–4 74753–18–7	Karc. kat. 2; R45 Xn; R22 N; R51–53	T; N R: 45–22–51/53 S: 53–45–61		
612–099–00–3	4-metyl-m-fenyléndiamín 2,4-toluéndiamín	E	202–453–1	95–80–7	Karc. kat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51–53	T; N R: 45–21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
612–105–00–4	2-piperazín-1-yletylamín		205–411–0	140–31–8	Xn; R21/22 C; R34 R43 R52–53	C R: 21/22–34–43–52/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
612–111–00–7	2-metyl-m-fenyléndiamín 2,6-toluéndiamín		212–513–9	823–40–5	Muta. kat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51–53	Xn; N R: 21/22–40–43–51/53 S: (2-)24–36/37–61		
612–125–00–3	2-metyl-p-fenyléndiamín 2,5-toluéndiamín		202–442–1	95–70–5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51–53	T; N R: 20/21–25–43–51/53 S: (1/2-)24–37–45–61		
612–144–00–7	flumetralin (ISO) *N*-(2-chlór-6-fluorbenzyl)-N-ethyl- alfa, alfa, alfa- trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidín		—	62924–70–3	Xi; R36/38 R4 3 N; R50–53	Xi; N R: 36/38–43–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
612–151–00–5	diaminotoluén	E	246–910–3	25376–45–8	Karc. kat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51–53	T; N R: 45–20/21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
613–018–00–4	morfamquat (ISO) ión 1,1'-bis(3,5-dimetylmorfolinokarbonyl-metyl)-4,4'-bipyridiliový		—	7411–47–4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52–53	Xn R: 22–36/37/38–52/53 S: (2-)22–36–61		
613–031–00–5	symklosén kyselina trichlórizokyanomočová trichlór-1,3,5-triazintrion		201–782–8	87–90–1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50–53	O; Xn; N R: 8–22–31–36/37–50/53 S: (2-)8–26–41–60–61		
613–038–00–3	6-fenyl-1,3,5-triazín-2,4-diyldiamín 6-fenyl-1,3,5-triazín-2,4-diamín benzoguanamín		202–095–6	91–76–9	Xn; R22 R52–53	Xn R:22–52/53 S: (2-)61		
613–042–00–5	imazalil (ISO) 1-[2-(allyloxy)-2-(2,4-dichlórfenyl)etyl]-1H-imidazol		252–615–0	35554–44–0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50–53	Xn; N R: 20/22–41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		
613–043–00–0	imazalil-sulfát (ISO) 1-[2-(allyloxy)etyl 2-(2,4-dichlórfenyl) etyl]-1H-imidazol hydrosíran [1] (+-)-1-[2-(allyloxy)etyl-2-(2,4-dichlórfenyl)] -1H-imidazol hydrosíran [2]		261–351–5 [1] 281–291–3 [2]	58594–72–2 [1] 83918–57–4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50–53	Xn; N R: 20/22–41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
613–066–00–6	terbumeton (ISO) 2-tert-butylamino-4-(etylamino)-6-methoxy-1,3,5-triazín		251–637–8	33693–04–8	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
613–091–00–2	morfamquát dichlorid morfamquát-sulfát [2]		225–062–8 [1]	4636–83–3 [1] 29873–36–7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52–53	Xn; R: 22–36/37/38–52/53 S: (2-)22–36–61		
613–098–00–0	N-(n-oktyl)-2-pyrrolidinon		403–700–8	2687–94–7	C; R34 N; R51–53	C; N R: 34–51/53 S: (1/2-)23–26–36/37/39–45–61		
613–130–00–3	hexakonazol (ISO) (RS)-2-(2,4-dichlórfenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol		—	79983–71–4	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–131–00–9	pyrochilon (ISO) 1,2,5,6-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]chinolin-4-on		—	57369–32–1	Xn; R22 R52–53	Xn R:22–52/53 S: (2-)61		
613–134–00–5	myklobutanil (ISO) 2-(4-chlórfenyl)-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetyl]hexánnitril		—	88671–89–0	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51–53	Xn; N R: 22–36–51/53–63 S: (2-)36/37–46–61		
613–137–00–1	methabenzthiazuron (ISO) 1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1,3-dimetylmočovina		242–505–0	18691–97–9	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
613–139–00–2	metsulfuron-metyl metyl 2-(4-metoxy-6-metyl-1,3,5-triazín-2-ylkarbamoylsulfamoyl) benzoan		—	74223–64–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
614–001–00–4	nikotin (ISO) 3-(N-metyl-2-pyrrolidinyl)pyridín		200–193–3	54–11–5	T+; R27 T; R25 N; R51–53	T+; N R: 25–27–51/53 S: (1/2-)36/37–45–61		
614–006–00–1	brucín 2,3-dimetoxystrychnín		206–614–7	357–57–3	T+; R26/28 R52–53	T+ R:26/28–52/53 S: (1/2-)13–45–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
614–007–00–7	síran brucínu [1] dusičnan brucínu [2] strychnidin-10-on, 2,3-dimetoxy-ono[(R)-1-metylheptyl 1,2-benzéndikar-boxylát] [3] strychnidin-10-on, 2,3-dimetoxy-zlúčenina s (S)-mono(1-metylheptyl-1,2-benzén-dikarboxylátom (1:1) [4]		225–432–9 [1] 227–317–9 [2] 269–439–5 [3] 269–710–8 [4]	4845–99–2 [1] 5786–97–0 [2] 68239–26–9 [3] 68310–42–9 [4]	T+; R26/28 R52–53	T+ R: 26/28–52/53 S: (1/2-)13–45–61		
615–006–00–4	2-metyl-m-fenylén diizokyanatan [1] 4-metyl-m-fenylén diizokyanatan [2] m-tolylidén diizokyanatan [3] toluén-2,6-diizokyanatan [1] toluén-2,4-diizokyanatan [2] toluén-diizokyanatan [3]	C	202–039–0 [1] 209–544–5 [2] 247–722–4 [3]	91–08–7 [1] 584–84–9 [2] 26471–62–5 [3]	Karc. kat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52–53	T+ R: 26–36/37/38–40–42/43–52/53 S: (1/2-)23–36/37–45–61	C≥ 20 %: T+; R26–36/37/38–40–42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26–40–42/43 1 % ≤ C < 7 %: T; R23–40–42/43 0,1 % ≤ C < 1 %:Xn; R20–42	2
616–010–00–9	tosylchloramid sodný		204–854–7	127–65–1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22–31–34–42 S: (1/2-)7–22–26–36/37/39–45		
616–034–00-X	pyrakarbolid (ISO) 3,4-dihydro-6-metyl-H-pyran-5-karboxanilid		246–419–4	24691–76–7	R52–53	R: 52/53 S: 61		
616–035–00–5	Cymoxanil 2-kyano-N-[(etylamino)karbonyl]-2-(metoxyimino)acetamid		261–043–0	57966–95–7	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
617–004–00–9	1,2,3,4-tetrahydro-1-naftyl hydroperoxid		212–230–0	771–29–9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50–53	O; C; N R: 7–22–34–50/53 S:(1/2-)3/7–14–26–36/37/39–45–60–61	C≥ 25 %: C; R22–34 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
617–006–00-X	bis(α, α-dimetylbenzyl)peroxid		201–279–3	80–43–3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51–53	O; Xi; N R: 7–36/38–51/53 S: (2-)3/7–14–36/37/39–61		
617–008–00–0	dibenzoyl peroxid benzoyl peroxid		202–327–6	94–36–0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2–36–43 S: (2-)3/7–14–36/37/39		
650–007–00–3	chlordimeform (ISO) N^2-(4-chlor-o-tolyl)-N^1, N^1-dimetylformamidín		228–200–5	6164–98–3	Karc. kat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50–53	Xn; N R: 21/22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
650–008–00–9	drazoxolon (ISO) 4-(2-chlórfenylhydrazono)-3-metyl– 5-izoxazolon		227–197–8	5707–69–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-) 22–24–36/37–45–60–61		
650–009–00–4	chlordimeform-hydrochlorid *N*'-(4-chlór-*o*-tolyl)-*N*,*N*-dimetylformamidín hydrochlorid N^2-(4-chlór-o-tolyl)-N^1,N^1-dimetylformamidín hydrochlorid		243–269–1	19750–95–9	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		
650–033–00–5	esfenvalerát (ISO) (S)-alfa-kyano-3-fenoxybenzyl-(S)-2-(4-chlórfenyl)-3-metylmaslan		—	66230–04–4	T; R23/25 R43 N; R50–53	T; N R: 23/25–43–50/53 S: (1/2-)24–36/37/39–45–60–61		
650–041–00–9	triasulfuron (ISO) 1-[2-(2-chloroethoxy) fenylsulfonyl]-2-(4-metoxy-6-metyl-1,3,5-triazín-2-yl)močovina		—	82097–50–5	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

PŘÍLOHA 1D

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
006–090–00–8	2-[(3-jodprop-2-yn-1-yl)oxy]etyl-N-fenylkarbamidan		408–010–0	88558–41–2	Xn; R20 Xi; R41 R52–53	Xn R: 20–41–52/53 S: (2-)22–26–39–61		
014–016–00–0	Zmes: 1,3-di(hex-5-en-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyldisiloxan a 1,3-di(hex-*x*-en-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyldisiloxan		406–490–6	—	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
015–164–00–9	kalcium-dihydrogen-(1-hydroxyethylen)bisfosfonát dihydrát		400–480–5	36669–85–9	R52–53	R:52/53 S: 61		
015–165–00–4	Zmes: *S*, *S*, *S*, *S*′-tetrafenyl-4,4′-sulfandiylbis(fenylsulfonium)-bis(hexafluorofosfát); difenyl[4-(fenylsulfanyl)fenyl]sulfonium-hexafluorofosfát		404–986–7	—	Xi; R41 N; R50–53	Xi; N R: 41–50/53 S: (2-)15–26–39–60–61		
015–166–00-X	3,9-bis(2,6-di-tert-butyl-4-metylfenoxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difosfaspiro[5.5]undekan		410–290–4	80693–00–1	R53	R:53 S: 61		
015–167–00–5	kyselina 3-[hydroxy(fenyl)fosfinoyl]propanová		411–200–6	14657–64–8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601–050–00–1	benzén; C_{10}-C_{13}-alkylderiváty		267–051–0	67774–74–7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601–051–00–7	4-fenylbut-1-en		405–980–7	768–56–9	Xi; R38 N; R51–53	Xi; N R: 38–51/53 S: (2-)37-61		
602–083–00–4	difenyléter, pentabrómderivát		251–084–2	32534–81–9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50–53	Xn; N R: 48/21/22–50/53–64 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
602–084–00-X	1,1-dichlór-1-fluoretán		404–080–1	1717–00–6	N; R52–53–59	N R: 52/53–59 S: 59-61		
603–128–00–0	2-(fenylmetoxy)naftalén		405–490–3	613–62–7	R53	R:53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
603–129–00–6	1-tert-butoxypropan-2-ol		406–180–0	57018–52–7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603–130–00–1	Zmes izomérov:α-(dimetylbifenylyl)-ω-hydroxypoly(oxyetylén)		406–325–8	—	Xn; R22 R52–53	Xn R:22–52/53 S: (2-)39-61		
603–131–00–7	Zmes (3:1):1-deoxy-1-[metyl(1-oxododecyl)amino]-D-glucitol;1-deoxy-1-[metyl(1-oxotetradecyl)amino]-D-glucitol		407–290–1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603–132–00–2	2-(hydroxymetyl)-6-izopropyl-9-metyl-1,4-dioxaspiro[4.5]dekan		408–200–3	63187–91–7	Xi; R38–41 R52–53	Xi R:38–41–52/53 S: (2-)26–37/39–61		
603–133–00–8	Zmes:3-(4-amino-2-chlóro-5-nitroanilino)propan-1,2-diol;3,3′-[(2-chlór-5-nitro-1,4-fenylen)diimino]di(propán-1,2-diol)		408–240–1	—	Xn; R22 R52–53	Xn R:22–52/53 S: (2-)22–36–61		
603–134–00–3	Zmes: alkyl(C_1-C_{10})-dodecyldifenyléter a alkyl(C_1-C_{10})-tetradecyldifenyléter (dodecyl a tetradecyl nerozvetvené).		410–450–3	—	R53	R: 53 S: 61		
603–135–00–9	bis[2-(2-metoxyetoxy)etanolato]bis (2,2′, 2-nitrilotrietan-1-olato-N, O)titaničitý komplex		410–500–4	—	Xi; R41 N; R51–53	Xi; N R: 41–51/53 S: (2-)26–39–61		
603–136–00–4	3-{4-[bis(2-hydroxyetyl)amino]-2-nitroanilino}propan-1-ol		410–910–3	104226–19–9	R43 R52–53	Xi R:43–52/53 S: (2-)24–37–61		
603–137–00-X	zmes:1-deoxy-1-[metyl(1-oxohexadecyl)amino]-D-glucitol;1-deoxy-1-[metyl(1-oxooktadecyl)amino]-D-glucitol		411–130–6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603–138–00–5	3-(2,2-dimetyl-3-hydroxypropyl)toluen; 2,2-dimetyl-3-(3-metylfenyl)propan-1-ol		403–140–4	103694–68–4	R52–53	R:52/53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
604–050–00-X	4-chlór-o-kresol 4-chlór-2-metylfenol		216–381–3	1570–64–5	T; R23 C; R 35 N; R50	T; C; N R: 23–35–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 25 %: T; C; R23–35 10 % ≤ C < 25 %: C; R20–35 5 % ≤ C < 10 %: C; R20–34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R20–36/37/38 1 % ≤ C < 3 %:Xi; R36/37/38	
604–051–00–5	3,5-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-2,4,6-trimetylfenol		401–110–5	87113–78–8	R52–53	R:52/53 S: 61		
604–052–00–0	2,2′-metylénbis[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenol] 6,6′-bis(2*H*-benzotriazol-2-yl)- 4,4′-bis(1,1,3,3-tetrametyl-butyl)- 2,2′-metyléndifenol		403–800–1	103597–45–1	R53	R:53 S: 61		
604–053–00–6	4-tert-butyl-2-metyl-6-(1-metylpentadecyl)fenol		410–760–9	157661–93–3	Xi; R38 R43 N; R50–53	Xi; N R: 38–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
604–054–00–1	Zmes:2-metoxy-4-(4-metylidéntetrahydropyran-2-yl)fenol; 2-metoxy-4-(4-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)fenol		412–020–0	—	R43 R52–53	Xi R:43–52/53 S: (2-)24–37–61		
604–055–00–7	4,4′-bis[(2,3-epoxypropyl)oxy]- 3,3′, 5,5′-tetrametylbifenyl		413–900–7	85954–11–6	Muta. Kat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22–36–37		
605–027–00–7	Zmes: 3a, 4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-metano-1H-inden-6-karbaldehyd; 3a, 4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-metano-1H-inden-5-karbaldehyd		410–480–7	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
606–051–00–0	4-pentylcyklohexanon 4-pentylcyklohexan-1-on		406–670–4	61203–83–6	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
606–052–00–6	4-(N, N-dibutylamino)-2-hydroxy-2′-karboxybenzofenon 2-[4-(dibutylamino)-2-hydroxybenzoyl]benzoová kyselina		410–410–5	54574–82–2	R52–53	R:52/53 S: 61		
607–272–00–5	fluoroxypyr-meptyl (ISO) [1] fluoroxypyr-butometyl (ISO) [2] metylheptyl-[(4-amino-3,5-dichlór-6-fluór-2-pyridyl)oxy]octan [1] 1-metylheptyl-[4(amino-6-fluór-3,5 dichlórpyridín-2-yl)oxy]acetát [2]		279–752–9 [1] —	81406–37–3 [1] 154486–27–8 [2]	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–273–00–0	amonium-7-{2,6-dimetyl-8-[(2,2-dimetylbutanoyl)oxy]- 1,2,6,7,8,8a-hexahydro-1-naftyl}- 3,5-dihydroxyheptanoát		404–520–2	—	R52–53	R:52/53 S: 61		
607–274–00–6	{2-[benzyl(metyl)amino]etyl}-3-aminobut-2-enoát		405–350–1	54527–73–0	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–275–00–1	natrium-4-(benzoyloxy)benzen-1-sulfonát		405–450–5	66531–87–1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607–276–00–7	[bis(2-etylhexanoato) bis(1-metylimidazol)]zinočnatý komplex		405–635–0	—	Xi; R38–41 N; R50–53	Xi; N R: 38–41–50/53 S: (2-)26–37/39–60–61		
607–277–00–2	Zmes: 2-(hexylsulfanyl)etylamin-hydrochlórid a natrium-propionát		405–720–2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 22–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–278–00–8	Zmes:alkyl(C_7-C_9 rozvetvené a nerozvetvené)-3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyfenyl]propanoáty		405–760–0	—	Xi; R41 R43 R52–53	Xi R: 41–43–52/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–279–00–3	Zmes:(oktadecylimino)dietylén-bis(hydrogen-maleinát); (oktadecylimino)dietylén-(hydrogen-ftalát)-(hydrogen-maleinát)		405–960–8	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–280–00–9	4-chlór-1-hydroxybutan-1-sulfonát sodnýnátrium-4-chlór-1-hydroxybutan-1-sulfonát		406–190–5	54322–20–2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22–36–43 S: (2-)22–26–36/37		
607–281–00–4	Zmes:alkyl(C_7-C_9 rozvetvené a lineárne)-3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-terc-butyl-4-hydroxyfenyl]propanoáty		407–000–3	127519–17–9	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–282–00-X	2-(acetoxymetyl)-4-(benzyloxy)butyl-octan		407–140–5	131266–10–9	R52–53	R: 52/53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–283–00–5	etyl-(E)-4-fenyl-4-oxobut-2-enoát etyl-(E)-4-fenyl-4-oxokrotonát		408–040–4	15121–89–8	Xn; R21/22 Xi; R38–41 R43 N; R50–53	Xn; N R: 21/22–38–41–43–50/53 S: (2-)26–36/37/39–60–61		
607–284–00–0	Zmes (9:1):natrium-3,3′-{(1,4-fenylen)bis[(karbonylimino)(propan-3,1-diyl)imino]}bis(10-amino-6,13-dichlór[1,4]benzoxazino[2,3-b]fenoxazin-4,11-disulfonát);lítium-3,3′-{(1,4-fenylen)bis[(karbonylimino)(propan-3,1-diyl)imino]}bis(10-amino-6,13-dichlór[1,4]benzoxazino[2,3-b]fenoxazin-4,11-disulfonát)		410–040–4	136213–76–8	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–285–00–6	Zmes:7-(3-aminobenzénsulfonamido)naftalén-1,3-disulfonová kyselina;kalium-7-(3-aminobenzensulfonamido)naftalén-1,3-disulfonát a natrium-7-(3-aminobenzénsulfonamido)naftalén-1,3-disulfonát		410–065–0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
607–286–00–1	Zmes:kalium/natrium-7-[4-({4-[(2-hydroxy-1-naftyl)azo]fenyl}azo)benzensulfonamido] naftalén-1,3-disulfonát		410–070–8	141880–36–6	R43 R52–53	Xi R:43–52/53 S: (2-)22–24–37–61		
607–287–00–7	metyl-[1-metyl-2-(metakryloyloxy)etyl]-1,2,3,6-tetrahydroftalát		410–140–8	—	R52–53	R:52/53 S: 61		
607–288–00–2	[c-(N-{3-[(1-{3-[(2,6(4,6)-dichlór-5-kyanpyrimidin-4(2)-yl)metylamino]propyl}-2-hydroxy-4-metyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridyl)azo]-4-sulfonatofenyl}sulfamoyl)-a, b, d-trisulfonatoftalocyanin]nikelnatý komplex, tetrasodná soľ; c = 15, 16, 17 alebo 18, a = 1, 2, 3 alebo 4, b = 8, 9, 10 alebo 11, d = 22, 23, 24 alebo 25 a kde e a f spolu sú 2 a 4 alebo 4 a 2 každý zvlášť		410–160–7	148732–74–5	Xi; R36 R43 R52–53	Xi R: 36–43–52/53 S: (2-)22–26–36/37–61		
607–288–00–8	3-[(3-{N-[4-(2,4-di-tert-pentylfenoxy)butyl]karbamoyl}-4-hydroxy-1-naftyl)sulfanyl]propanová kyselina		410–370–9	105488–33–3	R53	R:53 S: 61		
607–290–00–3	Zmes (neznámeho pomeru): amonium-1-alkyl(C_{14}-C_{18})-4-[3-(allyloxy)-2-hydroxypropyl]-2-sulfonatobutandioát; amonium-4-alkyl(C_{14}-C_{18})-1-[3-(allyloxy)-2-hydroxypropyl]-2-sulfonatobutandioát		410–540–2	—	Xi; R38 R43 N; R50–53	Xi; N R: 38–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
607–291–00–9	dodecyl-ω-cyklopentyl(alebo cyklohexyl)alkanoát		410–630–1	104051–92–5	R53	R: 53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–292–00–4	Zmes: [2-(alkyl(C_{12})oxy)-1-(metoxymetyl)etoxy]octová kyselina; [2-(alkyl(C_{14})oxy)-1-(metoxymetyl)]octová kyselina		410–640–6	—	Xi; R38–41 N; R50–53	Xi; N R: 38–41–50/53 S: (2-)26–37/39–60–61		
607–293–00-X	Zmes:1-(2-aminoetyl)piperazin-1,4-diium-[(2,4,6-trimetylnonyl)fenoxy]benzendisulfonát;1-(2-aminoetyl)piperazin-1,4-diium-[bis(2,4,6-trimetylnonyl)fenoxy]benzendisulfonát		410–650–0	—	Xi; R41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 41–43–51/53 S: (2-)26–36/37/39–61		
607–294–00–5	nátrium-2-(benzoyloxy)-1-hydroxyetán-1-sulfonát		410–680–4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607–295–00–0	Zmes:tetranatrium-fosfonobutandioát; hexanatrium-fosfonobutan-1,2,3,4-tetrakarboxylát		410–800–5	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–296–00–6	Zmes:tetraestery pentaerytritolu, heptanová kyselina a 2-etylhexanová kyselina		410–830–9	—	R53	R: 53 S: 61		
607–297–00–1	3,3′-(1,4-fenylendimetylidén)bis(2-oxobornan-10-sulfonová kyselina) 2,2′-dioxo-3,3′-(1,4-fenylendimetylidén)bis(1,7,7-trimetylbicyklo[2.2.1]heptán-1-metansulfonová kyselina)		410–960–6	92761–26–7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607–298–00–7	[2-(trimetylamonio)etyl]-4-sulfonatobenzoát		411–010–3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–36/37		
607–299–00–2	metyl-3-(acetylsulfanyl)-2-metylpropanoát		411–040–7	97101–46–7	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
607–300–00–6	[a-(N-{4-[(5-chlór-2,6-difluorpyrimidin-4-yl)amino]-3-karboxylatofenyl}sulfamoyl)-b-sulfamoyl-c, d-sulfonatoftalocyanin]meďnatý komplex, trizodná soľ; a = 1,2,3 alebo 4, b = 8, 9, 10 alebo 11, c = 15, 16, 17 alebo 18, d = 22, 23, 24 alebo 25		411–430–7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
607–301–00–1	Zmes:dodekanová kyselina; dodekanoáty oligo(1-7)laktátov		411–860–5	—	Xi; R38–41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 38–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
607–302–00–7	Zmes:tetradekanová kyselina; tetradekanoáty oligo(1-7)laktátov		411–910–6	—	Xi; R38–41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 38–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–303–00–2	1-cyklopropyl-6,7-difluor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina		413–760–7	93107–30–3	Repr. kat.3; R62 R52–53	Xn R: 62–52/53 S: (2-)22–36/37–61		
608–023–00–3	4-(4-chlórfenyl)-2-fenyl-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)metyl]butannitril		406–140–2	114369–43–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
608–024–00–9	2-{4-[butyl(fenetyl)amino]fenyl}etén-1,1,2-trikarbonitril		407–650–8	97460–76–9	R53	R:53 S: 61		
608–025–00–4	[2-nitro-4,5-bis(benzyloxy)fenyl]acetonitril		410–970–0	117568–27–1	R53	R:53 S: 61		
609–053–00-X	hydrazinium-trinitrometanid		414–850–9	—	E; R3 O; R8 Karc. kat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45–3–8–23/25–43 S: 53-45		
610–010–00–2	1-brom-2-(2-furyl)-1-nitroetén		406–110–9	35950–52–8	Xn; R22–48/22 C; R34 R43 N; R50–53	C; N R: 22–34–43–48/22–50/53 S: (1/2-)22–26–36/37/39–45–60–61		
611–043–00–5	Zmes (2:1:1): [bis(6-{[1-(N-fenylkarbamoyl)-2-hydroxyprop-1-en-1-yl]azo}-5-sulfamoyl-3-sulfonatonaftalen-2-azo-1′-benzén-1,2′-diolato)]chromitan trisodný, [bis{6-[(2-amino-4-hydroxyfenyl)azo]-alebo 6-[(2-amino-6-hydroxyfenyl)azo]-alebo 6-[(4-amino-2-hydroxyfenyl)azo]-5-sulfamoyl-3-sulfonatonaftalén-2-azo-1′-benzén-1,2′-diolato}]chromitan trisodný; [{6-[(2-amino-4-hydroxyfenyl)azo]-alebo 6-[(2-amino-6-hydroxyfenyl)azo]-alebo 6-[(4-amino-2-hydroxyfenyl)azo]-5-sulfamoyl-3-sulfonatonaftalén-2-azo-1′-benzén-1,2′-diolato}(6-{[1-(N-fenylkarbamoyl)-2-hydroxyprop-1-en-1-yl]azo}-5-sulfamoyl-3-sulfonatonaftalen-2-azo-1′-benzén-1,2′-diolato)]chromitan trisodný		402–850–1		Xi; R41 R52–53	Xi R: 41–52/53 S: (2-)26–39–61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
611–044–00–0	Zmes: [bis(5-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)]chromitan tert-alkyl (C_{12}-C_{14})amonný, [bis(4-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)]chromitan tert-alkyl(C_{12}-C_{14})amonný, [bis(5-terc-butyl-3-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)]chromitan tert-alkyl(C_{12}-C_{14})amonný, [(5-tert-butyl-3-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)(5-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)]chromitan tert-alkyl (C_{12}-C_{14})amonný a [(4(5)-nitrobenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato) (3-nitro-5-pentylbenzén-1-azo-1′-naftalén-2,2′-diolato)]chromitan tert-alkyl(C_{12}-C_{14})amonný		403–720–7	117527–94–3	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
611–045–00–6	2-({4-[(4-acetoxybutyl)etylamino]-2-metylfenyl}azo)-3-acetyl-5-nitrotiofén		404–830–8	—	R53	R:53 S: 61		
611–046–00–1	4,4′-diamino-2-metylazobenzén 2-metylazobenzén-4,4′-diamin		407–590–2	43151–99–1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50–53	T; N R: 25–43–48/22–50/53 S: (1/2-)22–28–36/37–45–60–61		
611–047–00–7	Zmes (1:1):2-({4-[(2-acetoxyetyl)etylamino]fenyl}azo)-5,6-dichlórbenzotiazol; 2-({4-[(2-acetoxyetyl)etylamino]fenyl}azo)-6,7-dichlórbenzotiazol		407–890–3	111381–11–4	R53	R: 53 S: 61		
611–048–00–2	Zmes (1:1):2-({4-[bis(2-acetoxyetyl)amino]fenyl}azo)-5,6-dichlórbenzotiazol; 2-({4-[bis(2-acetoxyetyl)amino]fenyl}azo)-6,7-dichlórbenzotiazol		407–900–6	111381–12–5	R53	R: 53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
611–049–00–8	Zmes (2:1:1)7-[(4-{[3-(dietylamino)propyl]amino}-6-{[3-(dietylamonio)propyl]amino}- 1,3,5-triazin-2-yl)amino]-3-{[4-(fenylazo)fenyl]azo}-4-hydroxynaftalén-2-sulfonát, kyselina octová a mliečna kyselina (2:1:1)		408–000–6	118658–98–3	Xn; R48/22 R43 R52–53	Xn R: 43–48/22–52/53 S: (2-(22–36/37–61		
611–051–00–9	2-({4-[etyl(2-hydroxyetyl)amino]-2-metylfenyl}azo)-6-metoxy-3-metylbenzotiazolium-chlorid		411–110–7	136213–74–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
611–052–00–4	[aqua{4-[(2-hydroxy-3,5-dinitrofenyl) azo]-6-[(6-sulfonato-1-naftyl)azo]benzén-1,3-diolato}]železnatý komplex, sodná soľ		400–720–9	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
612–156–00–2	Zmes:trihexadecyl(metyl)amónium-chlorid a dihexadecyl(dimetyl)amónium-chlorid		405–620–9	—	Xi; R41 N; R50–53	Xi; N R: 41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		
612–157–00–8	(Z)-1-(1-benzotiofén-2-yl)etán-1-on-oxim-hydrochlorid		410–780–8	—	Xn; R22–48/22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 22–41–43–48/22–51/53 S: (2-)22–26–36/37/39–61		
612–158–00–3	Zmes: [bis(5-alkyl(rozvetvený C_{12}))-2-hydroxybenzaldoximato)]meďnatý komplex a 4-dodecyl-2-hydroxybenzaldoxim [bis(5-alkyl(rozvetvený C_{12}))-2-hydroxybenzaldoximato)]meďnatý komplex a 4-dodecylsalicylaldoxim		410–820–4	—	R53	R: 53 S: 61		
612–159–00–9	reakčné produkty zmesi 2,2,4-trimetyl- a 2,4,4-trimetylhexan-1,6-diaminu (v zozname EINECS), derivátov [(alkyl(C_{10}-C_{16})oxy)metyl]oxiranu (Epoxid 8) a 4-metylbenzén-1-sulfonovej kyseliny		410–880–1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50–53	C; N R: 22–34–50/53 S: (1/2-)23–26–36/37/39–45–60–61		
613–149–00–7	2-tert-butyl-5-[(4-terc-butylbenzyl)sulfanyl]-4-chlorpyridazin-3(2H)-on		405–700–3	96489–71–3	T; R23/25 N; R50–53	T; N R: 23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
613–150–00–2	2,2′-[piperazin-1,4-diyldi(propan-1,3-diyl)]bis(benzimidazo[2,1-b]benzo[l, m, n][3,8]fenantrolin-1,3,6-trion)		406–295–6	—	R53	R:53 S: 61		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
613–151–00–8	1-(2-deoxy-3-O-mesyl-5-O-trityl-β-D-treo-pentofuranosyl)-5-metylpyrimidin-2(1H), 4(3H)-dion		406–360–9	104218–44–2	R53	R:53 S: 61		
613–152–00–3	fenyl-N-(4,6-dimetoxypyrimidín-2-yl)karbamidan		406–600–2	89392–03–0	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–153–00–9	2,3,5-trichlórpyridín		407–270–2	16063–70–0	R52–53	R:52/53 S: 61		
613–154–00–4	2-amino-4-chlór-6-metoxypyrimidín		410–050–9	5734–64–5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613–155–00-X	5-chlór-2,3-difluorpyridin		410–090–7	89402–43–7	R10 Xn; R22 R52–53	Xn R: 10–22–52/53 S: (2-)23–36–61		
613–156–00–5	2-butyl-4-chlór-5-formylimidazol 2-butyl-5-chlórrimidazol-4-karbaldehyd		410–260–0	83857–96–9	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–157–00–0	2,4-diamino-5-(metoxymetyl) pyrimidín-5-(metoxymetyl)pyrimidín-2,4-diamín		410–330–0	54236–98–5	Xn; R22–48/22 Xi; R36	Xn R: 22–36–48/22 S: (2-)22–26–36		
613–158–00–6	2,3-dichlór-5-(trifluormetyl)pyridín		410–340–5	69045–84–7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 20/22–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
613–159–00–1	4-[2-(4-tert-butylfenyl)etoxy]chinazolín		410–580–0	120928–09–8	T; R25 Xn; R20 N; R50–53	T; N R: 20–25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
613–160–00–7	2-metyl-2,5-diazabicyklo[2.2.1]heptan-dihydrobromid		411–000–9	125224–62–6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615–022–00–1	metyl-3-(izokyanatosulfonyl)tiofén-2-karboxylát		410–550–7	79277–18–2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2–14–42/43–48/22 S: (2-)22–30–35–36/37		

Indexové číslo	Chemický názov	Poznámky k látkam	Číslo ES	Číslo CAS	Klasifikácia	Označenie	Koncentračné limity	Poznámky k prípravkom
615–023–00–7	metylester 2-[(izokyanatosulfonyl)metyl]benzoové kyselinymetyl-2-[(izokyanatosulfonyl)metyl]benzoát		410–900–9	83056–32–0	R10 R14 Muta. kat. 3; R40 Xn; R20–48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10–14–20–40–41–42–48/22 S: (2-)23–26–36/37/39		
616–044–00–4	N-(3,5-dichlór-4-etyl-2-hydroxyfenyl)-2-(3-pentadecylfenoxy)butanamid		402–510–2	—	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
616–045–00-X	2′-[(4-chlór-5-formyl-3-kyan-2-tienyl)azo]-5′-(dietylamino)-2-metoxyacetanilid		405–190–2	122371–93–1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22–24–37–61		
616–046–00–5	N-[2-(6-chlór-7-metylpyrazolo[1,5-b][1,2,4]triazol-4-yl)propyl]-2-(2,4-di-tert-pentylfenoxy)oktanamid		406–390–2	—	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
616–047–00–0	Zmes: N, N′, N″, N″-tetraalkyl(C_{16}) 2,2′, 2″, 2″-(etyléndinitril)tetraacetamid a N, N′, N″, N″-tetraalkyl(C_{18})- 2,2′, 2″, 2″-(etyléndinitril)tetraacetamid-		406–640–0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616–048–00–6	3′-(trifluormetyl)izobutyranilid		406–740–4	1939–27–1	Xn; R48/22 N; R51–53	Xn; N R: 48/22–51/53 S: (2-)22–36–61		
616–049–00–1	2-(2,4-di-tert-butylfenoxy)-N-(3,5-dichlór-4-etyl-2-hydroxyfenyl)hexanamid		408–150–2	99141–89–6	R53	R:53 S: 61		
616–050–00–7	1-[2,5-dichlór-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluorpropoxy)fenyl]-3-(2,6-difluorfenyl)močovina		410–690–9	103055–07–8	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
616–051–00–2	Zmes: 3,3′-bis(4-metylfenyl)- 1,1′-(4-metyl-1,3-fenylen)dimočovina a 3,3′-bis (4-metylfenyl)-1,1′-(2-metyl-1,3-fenylen)dimočovinaZmes :2,4-bis[3-(4-metylfenyl)ureido]toluen a 2,6-bis[(3-(4-metylfenyl)ureido]toluen		411–070–0	—	R53	R: 53 S: 61		
617–015–00–9	bis(4-metylbenzoyl)peroxid		407–950–9	895–85–2	E; R2 O; R7 N; R50–53	E; N R: 2–7–50/53 S: (2-)7–14–36/37/39–47–60–61		
650–032–00-X	cyprokonazol (ISO) (2*R*, 3*R*)-, (2*S*, 3*S*)-, (2*R*, 3*S*)-, (2*S*, 3*R*)-2-(4-chlórfenyl)-3-cyklopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol		—	94361–06–5	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53–63 S: (2-)36/37–60–61		

PRÍLOHA 2

POVAHA ŠPECIFICKÝCH RIZÍK SPOJENÝCH S NEBEZPEČNÝMI LÁTKAMI A PRÍPRAVKAMI

Pozri smernicu Komisie 2001/59/ES, Ú. v. ES L 332, 28.12.2000, s. 81.

PRÍLOHA 3A

ŠTANDARDNÉ POKYNY PRE BEZPEČNÉ ZAOBCHÁDZANIE S NEBEZPEČNÝMI LÁTKAMI A PRÍPRAVKAMI

Pozri smernicu Komisie 2001/59/ES, Ú. v. ES L 332, 28.12.2000, s. 81.

PRÍLOHA 3B

ŠTANDARDNÉ POKYNY PRE BEZPEČNÉ ZAOBCHÁDZANIE S NEBEZPEČNÝMI LÁTKAMI A PRÍPRAVKAMI

Pozri smernicu Komisie 2001/59/ES, Ú. v. ES L 332, 28.12.2000, s. 81.

PRÍLOHA 4A

„B.10 MUTAGÉNNOSŤ - *IN VITRO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je duplikátom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997), označenej OECD TG 473.

1.1. *ÚVOD*

Účelom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať činidlá, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v pestovaných bunkách cicavcov (1)(2) (3). Štrukturálne odchýlky môžu byť v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov vyvoláva chromatidové odchýlky, avšak vyskytujú sa tiež chromozómové odchýlky. Nárast polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál spôsobiť číselné odchýlky. Táto metóda však nie je určená na meranie číselných odchýlok a bežne sa na tento účel nepoužíva. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómové mutácie a podobné udalosti spôsobujúce odchýlky onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri vzniku rakoviny u ľudí a pokusných zvierat.

In vitro test chromozómovej odchýlky u cicavcov môže obsahovať kultúry preukázaných bunkových línií, bunkové kmene alebo kultúry primárnych buniek. Použité bunky sú vyberané na základe rastovej schopnosti kultúry, stability karyotypu, chromozómového čísla, chromozómovej diverzity a spontánnej frekvencie chromozómových odchýlok.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky cicavcov in vivo. Je potrebné sa starostlivo vyhnúť podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť a ktoré môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (4) (5).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak medzi týmto testom a karcinogénnosťou neexistuje dokonalá korelácia. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je stále viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom mechanizmov odlišných od priameho poškodenia DNA.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a opätovné spojenie chromatidov.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA, jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16,… chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Mitotický: index: pomer buniek v metafáze delený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa šírenia tejto populácie.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného počtu chromozómov (n) odlišný od počtu diploidov (t. j. 3n, 4n, atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunkové kultúry sú exponované testovacou látkou s aj bez metabolickej aktivácie. Vo vopred určených intervaloch po expozícii bunkových kultúr testovacou látkou sa spracúvajú látkou zastavujúcou metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicínom), zozbierajú sa, zafarbia sa a metafázové bunky sa mikroskopicky analyzujú na zistenie prítomnosti chromozómových odchýlok.

1.4. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Môžu sa použiť rôzne bunkové línie, kmene alebo primárne bunkové kultúry, vrátane ľudských buniek (napríklad: fibroblasty čínskych morčiat, periférne krvné lymfocyty ľudí alebo iných cicavcov).

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Pri udržiavaní kultúr sa používajú príslušné médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, koncentrácia CO_2, teplota a vlhkosť). Získané bunkové línie a kmene sa pravidelne kontrolujú na stabilitu modálneho chromozómového čísla a absenciu mykoplazmatickej kontaminácie a v prípade kontaminácie sa nepoužívajú. Mal by byť známy čas normálneho bunkového cyklu a podmienky použitých kultúr.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Zistené bunkové línie a kmene: bunky sa odoberajú z uskladnených kultúr, zasievajú sa do média kultúry v takej hustote, pri ktorej kultúry nedosiahnu zhluk pred časom zberu, a inkubujú sa pri teplote 37 °C.

Lymfocyty: celá krv ošetrená antikoagulantom (napríklad: heparínom) alebo separované lymfocyty získané od zdravých subjektov sa pridávajú do média kultúry obsahujúceho mitogén (napríklad: fytohemaglutinín) a inkubované sa pri teplote 37 °C.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sú exponované testovacou látkou za prítomnosti i za neprítomnosti príslušného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9) pripravená z pečene hlodavcov ošetrených prípravkami na indukciu enzýmov ako napríklad Aroclorom 1254 (6) (7) (8) (9), alebo zmesou fenobarbitonu a beta-naftoflavónu (10) (11) (12).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1-10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

Pre endogénnu aktiváciu môže poskytnúť potenciál množstvo situácií, vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy. Výber použitých bunkových línií by mal byť vedecky podložený (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzýmu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Testovacia látka/príprava*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozriedťujú, ak je to vhodné pred ošetrením buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrením. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa kedykoľvek kedťe to možné, zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní látok vo vode nestabilných by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu je možné odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. **Koncentrácie pri expozícii**

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patria cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad: stupňa zhlukovania, počtu životaschopných buniek alebo mitotického indexu. Užitočné môže byť stanoviť cytotoxicitu a rozpustnosť v predbežnom pokuse.

Používajú sa najmenej tri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie majú byť oddelené nie viac ako koeficientom medzi 2 a $\sqrt{10}$. V čase zberu by mala najvyššia koncentrácia ukazovať významný pokles stupňa zhlukovania, počtu buniek alebo mitotického indexu (všetky viac ako 50 %). Mitotický index je iba nepriamym meradlom cytotoxických/cytostatických účinkov a závisí od času po ošetrení. Mitotický index je však akceptovateľný pre suspenzné kultúry, v ktorých iné merania toxicity môžu byť náročné a nepraktické. Informácie o kinetike bunkových cyklov, ako napríklad priemerný generačný čas (average generation time — AGT) sa môžu použiť ako doplnkové informácie. AGT je však celkovým priemerom, ktorý nie vždy odhaľuje existenciu oneskorených subpopulácií a aj malé zvýšenie priemerného generačného času môže byť spojené s veľmi podstatným oneskorením času optimálneho výťažku odchýlok.

Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 µl/ml, 5mg/ml alebo 0,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

Pre relatívne nerozpustné látky, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách nižších ako nerozpustné koncentrácie, najvyššia použitá dávka je koncentráciou nad limit rozpustnosti v konečnom médiu kultúry na konci ošetrovacieho obdobia. V niektorých prípadoch (napríklad keď sa vyskytne toxicita len na vyššej ako najnižšej nerozpustnej koncentrácii), je vhodné testovať na viac než jednej koncentrácii s viditeľným zrážaním. Užitočné môže byť odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu expozície v testovacom systéme kvôli prítomnosti buniek, séra S9, atď. Nerozpustnosť sa dá zistiť voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Negatívne a pozitívne kontroly*

Každý pokus má obsahovať pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontroly, a to obe, s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie je pozitívna kontrolná chemikália tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Pozitívne kontroly využívajú známy elastogén s úrovňami vystavenia, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast na pozadí, ktoré preukazuje citlivosť testovacieho systému.

Koncentrácie pozitívnej kontrolnej látky sa volia tak, aby boli účinky jasné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných sklíčok. Príklady pozitívnych kontrolných látok:

Stav metabolickej aktivácie	Látka	č. CAS	č. Einecs
Neprítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	metylmetánsulfonát	66–27–3	200–625–0
	etylmetánsulfonát	62–50–0	200–536–7
	etylnitrozkarbamid	759–73–9	212–072–2
	mytomicin C	50–07–7	200–008–6
	4-nitrochinolín-N-oxid	56–57–5	200–281–1
Prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	benzo[a]pyrén	50–32–8	200–028–5
	cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
	monohydrát cyklofosfamidu	6055–19–2	

Je možné použiť iné vhodné pozitívne kontrolné látky. Podľa dostupnosti sa tiež zváži použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v chemickej triede.

Negatívne kontroly, pozostávajúce iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu,

a ošetrené rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry, sa zahrnú pre každý čas zberu. Používajú sa tiež neošetrené kontrolné látky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje poukazujúce na to, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

1.4.3. Postup

1.4.3.1. *Pôsobenie testovacej látky*

Na rozširujúce sa bunky pôsobí testovacia látka za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Ošetrenie lymfocytov by malo začať približne 48 hodín po mitogénnej stimulácii.

1.4.3.2. Pri každej koncentrácii sa používajú duplicitné kultúry a rozhodne sa odporúčajú pre negatívne/rozpúšťadlové kontrolné kultúry. Ak je možné demonštrovať minimálnu variáciu medzi duplicitnými kultúrami (13) (14) z historických údajov, môže byť pre jednotlivé kultúry prijateľné použitie pri každej koncentrácii.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad v hermeticky uzavretých nádobách (15) (16).

1.4.3.3. *Čas zberu kultúry*

Pri prvom pokuse sú bunky vystavené testovacej látke, a to s metabolickou aktiváciou aj bez metabolickej aktivácie na 3-6 hodín, a vzorky z nich sa odoberajú v čase rovnajúcom sa približne 1,5 násobku dĺžky bežného cyklu buniek po začatí pokusu (12). Ak tento protokol ukáže negatívne výsledky s aktiváciou i bez aktivácie, uskutoční sa ďalší pokus bez aktivácie s neustálym podávaním až po odobratie vzorky v čase rovnajúcom sa približne 1,5 násobku dĺžky bežného cyklu buniek. Niektoré chemikálie sa dajú jednoduchšie zistiť pri časoch dlhších ako 1,5 násobok dĺžky cyklu. Negatívne výsledky s metabolickou aktiváciou sa musia potvrdiťodprípadukprípadu. V tých prípadoch, keď potvrdenie negatívnych výsledkov sa nepovažuje za potrebné, vypracuje sa zdôvodnenie.

1.4.3.4. *Príprava chromozómov*

Bunkové kultúry sa ošetrujú Colcemidom® alebo colchicinom zvyčajne 1-3 hodiny pred zberom. Každá bunková kultúra sa zbiera a spracováva oddelene na prípravu chromozómov. Príprava chromozómov zahŕňa hypotonické ošetrenie buniek, fixáciu a sfarbenie.

1.4.3.5. *Analýza*

Všetky sklíčka, vrátane sklíčok s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami, sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže fixačné postupy často ústia do pretrhnutia časti metafázových buniek so stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by preto mali obsahovať niekoľko centromér rovnajúcich sa modálnemu číslu ≠2 pre všetky typy buniek. Na jednu koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vyhodnocuje najmenej 200 dobre rozšírených metafáz, rovnakým dielom rozdelených medzi duplikátmi. Tento počet je možné znížiť, ak sa pozoruje vysoký počet odchýlok.

Hoci účelom tohto testu je zistiť štrukturálne chromozómové odchýlky, je dôležité zaznamenať polyploidiu a endoreduplikáciu, keď tieto javy sú pozorované.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Experimentálnou jednotkou je bunka, a preto sa hodnotí percentuálny podiel buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa nezahŕňajú do celkovej frekvencie odchýlok.

Zaznamenávajú sa tiež súbežné merania cytotoxicity pre všetky ošetrené a negatívne kontrolné kultúry pri hlavných pokusoch.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Potreba potvrdenia negatívnych výsledkov bola uvedená v bode 1.4.3.3. Modifikácia študijných parametrov na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa zváži pri dodatočných pokusoch. Študijné parametre, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený

s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast počtu buniek s chromozómovými odchýlkami. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (3) (13). Štatistický význam nie je pre pozitívnu reakciu jediným určujúcim faktorom.

Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové odchýlky. Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu. (17) (18).

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča.

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— karyotyp a vhodnosť použitého typu bunky,

— neprítomnosť mykoplazmy, ak je to vhodné,

— informácie o dĺžke cyklu bunky,

— pohlavie darcov krvi, celej krvi alebo separovaných lymfocytov, použitý mitogén,

— počet prechodov, ak je to vhodné,

— metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné,

— modálne číslo chromozómov.

Podmienky testov:

— identita látky zadržiavajúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie expozície bunky,

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite

— a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

— skladba média, koncentrácia CO_2, ak je to vhodné,

— koncentrácia testovacej látky,

— objem nosiča a pridanej testovacej látky,

— inkubačná teplota

— inkubačná doba,

— trvanie ošetrovania,

— hustota buniek pri vysádzaní, ak je to vhodné,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie, vrátane kritérií prijateľnosti,

— pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,

— metódy prípravy vzoriek,

— kritériá pre hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných metafáz,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity, napríklad: stupeň hromadenia, údaje o cykle bunky, počty buniek, mitotický index,

— príznaky zrážania,

— údaje o pH a osmolalite média, ak sú stanovené,

— definícia odchýlok, vrátane trhlín,

— počet buniek s chromozómovými odchýlkami a typ chromozómových odchýlok uvedené oddelene pre každú ošetrenú a kontrolnú kultúru,

— zmeny v ploidii, ak sú pozorované,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak existujú,

— údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,

— historické údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **LITERATÚRA**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol. 4, Hollander, A. (ed), Plenum Press, New York a Londýn, s. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. a Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, vol. 5, Ashby, J. et al. (eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam — New York — Oxford, s. 427-432.

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. a Zeiger, E. (1978), Chromosome Aberration and Sister Chromatic Exchanges in Chinese Hamster Ovary Cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ, Molec. Mutagen*, 10 (suppl. 10) s. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. a Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, s. 147-204.

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

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

(7) Maron, D. M a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. a de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Dietylnitrozamine (DEN) a Dimetylnitrozamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, s. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. a Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in Vitro*, *Mutation Res.*, 66, s. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D. Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J, Fouts, J. R., Bend, J. R. a Philpot, R. M (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis testing*, Elsevier, North Holland, s. 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994) Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, s. 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. a Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data*, Kirkland, D. J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141-154.

(14) Soper, K. A. a Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *in Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, s. 139-149.

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

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. a Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, s. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese Hamster cells during Alpha Radiation Induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, s. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C., Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362-1364."

PRÍLOHA 4B

„B.11 MUTAGÉNNOSŤ — *IN VIVO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY V KOSTNEJ DRENI CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 475 *in vivo* testu chromozómovej odchýlky v kostnej dreni cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test chromozómovej odchýlky sa používa na zisťovanie štrukturálnych chromozómových odchýlok vyvolaných testovacou látkou v kostnej dreni zvierat, zvyčajne hlodavcov (1) (2) (3) (4). Štrukturálne chromozómové odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Zvýšenie hladiny polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál indukovať numerické odchýlky. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómového typu. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómové mutácie a podobné udalosti spôsobujúce zmeny onkogénov a génov na potláčanie nádorov sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a v pokusných systémoch.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Cieľovým tkanivom pri teste je kostná dreň, pretože je to vysoko vaskularizované tkanivo a obsahuje populáciu rýchlo cyklujúcich buniek, ktoré sa dajú jednoducho oddeliť a spracovať. Iné druhy a cieľové tkanivá sa pri tomto teste nepoužívajú.

Tento test chromozómovej odchýlky je osobitne relevantný pre hodnotenie mutagénnych rizík, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu od druhu k druhu a od tkaniva k tkanivu líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* testom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16,… chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného počtu chromozómov n) odlišný od počtu diploidov (t. j. 3n, 4n, atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sa exponujú testovacej látke vhodnou expozíciou a utratia sa vo vhodnom čase po ošetrení. Pred utratením sa zvieratá ošetria prostriedkom zastavujúcim metafázu (napríklad: Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa z kostnej drene urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a u metafázových buniek sa analyzujú chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, myši a čínske morčatá, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozrieďujú pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemalo mať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné, ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť pokiaľ, je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* pri úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám bolilátky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich

boli odoberané iba raz. Je možné zvážiť použitie che mikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu látok:

Látka	č. CAS	č. Einecs
etyl metánsulfonát	62–50–0	200–536–7
etylnitrozmočovina	759–73–9	212–072–2
mytomicin C	50–07–7	200–008–6
cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
monohydrát cyklofosfamidu	6055–19–2	
trietylénmelamín	51–18–3	200–083–5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín, ošetrených rozpúšťadlom alebo nosičom, a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý čas odberu. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne účinky.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia. Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké cesty expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú pri jednom ošetrení. Testovacie látky sa tiež môžu podávať v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia v ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

Vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrení v jeden deň. Pre hlodavce je prvým intervalom odberu vzorky 1,5 — násobok dĺžky bežného bunkového cyklu (zvyčajne 12-18 hodín) po ošetrení. Keďže čas potrebný na strávenie a metabolizmus testovacej látky ako aj jej účinky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálnu dobu pre zistenie chromozómovej odchýlky, odporúča sa neskoršie odobratie vzorky 24 hodín po prvom čase odberu vzorky. Ak sa používajú dávkovacie režimy dlhšie ako jeden deň, používa sa jeden odber vzorky pri 1,5 — násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po poslednom ošetrení.

Pred utratením sa zvieratám podáva injekčne intraperitoneálne potrebná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napríklad: Colcemid® alebo colchicin). Pouplynutí potrebného času sa následne odoberajú od zvierat vzorky. Pre myši je táto doba približne 3-5 hodín; pre čínske morčatá približne 4-5 hodín. Bunky sa zbierajú z kostnej drene a analyzujú sa chromozómové odchýlky.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (5). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad: vyššie ako 50 % — né zníženie mitotického indexu).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch úrovní dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava chromozómov**

Ihneď po utratení sa získava kostná dreň, ktorá sa vystaví hypotonickému roztoku a fixuje sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. **Analýza**

Mitotický index sa stanovuje ako meradlo cytotoxicity aspoň na 1 000 bunkách na jedno zviera pre všetky pokusné zvieratá (vrátane pozitívnej kontrolnej skupiny) a pre neošetrené negatívne kontrolné zvieratá.

Pre každé zviera sa analyzuje najmenej 100 buniek. Tento počet je možné znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka, vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy prípravy sklíčok často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote 2n ± 2.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek, počet odchýlok na bunku a percento buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre experimentálne a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok. Ak neexistujú dôkazy rozdielov medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (6). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Nárast polyploidie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál indukovať číselné chromozómové odchýlky. Nárast endoreduplikácie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (7) (8).

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča.

— rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava, atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie výberu konečnej úrovne,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie výberu spôsobu podávania,

— metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— metódy merania toxicity,

— identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá pre hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— typ a počet odchýlok uvedený jednotlivo za každé zviera,

— celkový počet odchýlok na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,

— počet buniek s odchýlkami na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,

— zmeny v ploidii, ak sú pozorované,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **LITERATÚRA**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests In Mammals, in : *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt a J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C., s. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. a Shelby, M. (1987), Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays. Analysis of Chromosome Aberration in Bone Marrow Cells, in: *Mutation Res.*, 189, s. 157-165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. a Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, new York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115-141.

(4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Soutou, S. a Vannier, B., (1994) Report from the Working Group on the *in vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosom Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, s. 305-312.

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

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III, Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (ed), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184-232.

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

(8) Huang, Y., Change, C. a Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362-1364.“

PRÍLOHA 4C

„B.12. MUTAGÉNNOSŤ — *IN VIVO* TEST MIKROJADRA ERYTROCYTU U CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou OECD TG 474 *in vivo* testu mikrojadra erytrocytu u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test mikrojadra erytrocytu u cicavcov sa používa na zisťovanie poškodenia vyvolaného testovacou látkou na chromozómoch alebo mitotickom aparáte erytroblastov analýzou erytrocytov odobratých z kostnej drene a/alebo periferálnych krvných buniek zvierat, zvyčajne hlodavcov.

Účelom testu mikrojadra je identifikovať látky, ktoré spôsobujú cytogenetické poškodenie s tvorbou mikrojadier obsahujúcich zaostávajúce chromozómové fragmenty alebo celé chromozómy.

Keď sa erytroblast kostnej drene vyvinie na polychromatický erytrocyt, hlavné jadro sa odpudzuje; akýkoľvek mikronukleus, ktorý sa vytvoril, môže ostať pozadu v inak anukleovanej cytoplazme. Vizualizácia mikrojadier je v týchto bunkách jednoduchšia, pretože nemajú hlavné jadro. Nárast frekvencie mikronukleovaných polychromatických erytrocytov u pokusných zvierat je indikáciou vyvolaného chromozómového poškodenia.

Pri tomto teste sa zvyčajne používa kostná dreň hlodavcov, keďže polychromatické erytrocyty sa tvoria v tomto tkanive. Meranie mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov v periférnej krvi je rovnako prijateľné pre akékoľvek druhy, u ktorých bola preukázaná neschopnosť sleziny odstraňovať mikronukleované erytrocyty, alebo ktoré vykázali rovnakú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo numerické chromozómové odchýlky. Mikrojadrá sa dajú rozlíšiť podľa niekoľkých kritérií. Ide napríklad o identifikáciu prítomnosti alebo neprítomnosti kinetochoru alebo centromerickej DNA v mikrojadrách. Frekvencia mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov je principiálnym hlavným parametrom. Počet zrelých (normochromatických) erytrocytov v periférnej krvi, ktorá obsahuje mikrojadrá medzi daným počtom zrelých erytrocytov sa tiež môže použiť ako parameter pokusu, ak tento prebieha štyri a viac týždňov.

Tento *in vivo* test mikrojadra cicavcov je pre hodnotenie mutagénneho rizika osobitne relevantný, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu z druhu na druh, z tkaniva na tkanivo a z géna na gén líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* systémom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Centromera (kinetochora): oblasť/oblasti chromozómu, s ktorými sú spojené vretenové vlákna počas delenia buniek umožňujúce riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Mikrojadrá: malé jadrá, oddelené od hlavných jadier buniek a pridaných k nim, vytvárané počas telofázy mitózy (meiózy) zaostávajúcimichromozómovými fragmentami alebo celými chromozómami.

Normochromatický erytrocyt: zrelý erytrocyt, ktorý neobsahuje ribozómy a od nezrelých, polychromatických erytrocytov sa líši škvrnami typickými pre ribozómy.

Polychromatický erytrocyt: nezrelý erytrocyt v medzištádiu vývoja, ktorý stále obsahuje ribozómy a preto sa od zrelých normochromatických erytrocytov líši škvrnami typickými pre ribozómy.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú vystavené testovacej látke príslušným spôsobom. Ak sa používa kostná dreň, zvieratá sa utratia vo vhodnom čase po podaní látky, kostná dreň sa vyberie a prípravky (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) sa zhotovia a zafarbia. Ak sa používa periférna krv, odoberá sa vo vhodnom čase po podaní látky a prípravky (4) (8) (9) (10) sa zhotovia a zafarbia. Pre štúdie s periférnou krvou by medzi poslednou expozíciou a zberom buniek mal ubehnúť minimálny čas. Preparáty sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšneho druhu*

Ak sa používa kostná dreň, odporúča sa použiť krysy a myši, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Ak sa používa periférna krv, odporúča sa použiť myši. Použiť sa však dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov za predpokladu, že ide o druh, v ktorom slezina neodstraňuje mikronukleované erytrocyty alebo druh, ktorý vykazuje primeranú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo číselné chromozómové odchýlky. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. **Kontrolné skupiny**

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívne kontrolné skupiny vytvárajú mikrojadrá *in vivo* v úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám sa látky podávali spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich sa odoberali iba raz. Je možné zvážiť použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v triede chemikálií, ak sú tieto dostupné. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	č. CAS	č. Einecs
etylmetánsulfonát	62–50–0	200–536–7
N-etyl-N-nitrozmočovina	759–73–9	212–072–2
mytomycin C	50–07–7	200–008–6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietylénmelamín	51–18–3	200–083–5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú aj vzorky z negatívnych kontrolných skupín ošetrených rozpúšťadlom alebo nosičom, a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý odber. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

Ak sa používa periférna krv, prijateľná je tiež vzorka pred podaním látky ako súbežná negatívna kontrola, ale len v prípadoch krátkych štúdií periférnej krvi (napríklad: 1-3 dávky), keď výsledné údaje sú v očakávanom rozsahu pre historickú kontrolu.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia (11). Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké spôsoby vystavenia, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia. Ak expozícia chemikálií na ľudí je závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram podávania**

Nedá sa odporučiť žiadny štandardný (t. j. jedna, dve alebo tri podania v 24-hodinových intervaloch) harmonogram podávania. Vzorky z predĺžených dávkovacích režimov sú prijateľné, pokiaľ bol pre túto štúdiu preukázaný pozitívny účinok, alebo pokiaľ bola pri negatívnej štúdii preukázaná toxicita alebo ak bola použitá limitná dávka a dávkovanie pokračovalo až do doby odberu vzorky. Testovacie látky tiež môžu byť podávané v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky.

Test sa môže uskutočniť dvoma spôsobmi:

a) zvieratám sa testovacia látka podá raz. Vzorky kostnej drene sa odoberú minimálne dvakrát, nie skôr ako 24 hodín po podaní, ale nie neskôr ako 48 hodín po podaní s primeranými intervalmi medzi odbermi. Uskutočnenie odberu skôr ako 24 hodín po podaní sa zdôvodní. Vzorky periférnej krvi sa

odoberú minimálne dvakrát, minimálne 36 hodín po podaní s primeranými intervalmi po odbere, ale nie neskôr ako po 72 hodinách. Pri zistení pozitívnej reakcie pri niektorom odbere nie je ďalší odber vzorky potrebný.

b) Ak sa použijú dve alebo viac dávok za deň (napríklad: dve alebo viac dávok v 24 hodinových intervaloch), vzorky sa odoberajú raz medzi 18. a 24. hodinou nasledujúcou po poslednej dávke pri kostnej dreni a raz medzi 36. a 48. hodinou po poslednej dávke pri periférnej krvi (12).

Ak je to relevantné, použijú sa sa ďalšie intervaly odberu vzoriek.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (13). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou z kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad: zníženie podielu nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov v kostnej dreni alebo periférnej krvi).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch objemov dávok sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávok pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava kostnej drene/krvi**

Bunky kostnej drene sa zvyčajne získavajú zo stehennej kosti (femur) alebo holennej kosti (tibia) ihneď po utratení. Zvyčajne sa bunky z týchto kostí odoberú, pripravia a zafarbia použitím bežných metód. Periférna krv sa získava z chvostovej žily alebo inej vhodnej žily. Krvné bunky sa ihneď supravitálne zafarbia (8) (9) (10) alebo sa urobia škvrnové prípravky, ktoré sa následne zafarbia. Použitie špecifického farbiva DNA (napríklad: akridínová oranž (14) alebo Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) môže odstrániť niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním nešpecifického farbiva DNA. Táto výhoda nedáva predpoklad používania konvenčných farbív (napríklad: Giemsa). Použiť sa tiež môžu dodatočné systémy (napríklad celulózne stĺpce na odstránenie nukleovaných buniek (16)) a to za predpokladu, že tieto systémy vykazujú v laboratórnych podmienkach primerané výsledky pri príprave mikrojadier.

1.5.7. **Analýza**

Pre každé zviera sa stanovuje podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov (zrelých plus nezrelých) spočítaním celkovo najmenej 200 erytrocytov pre kostnú dreň a 1 000 erytrocytov pre periférnu krv (17). Všetky sklíčka, vrátane sklíčok z negatívnycha pozitívnych kontrolných skupín, sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Na výskyt mikronukleovaných nezrelých erytrocytov sa počíta minimálne 2 000 nezrelých erytrocytov na jedno zviera. Dodatočné informácie je možné získať zaznamenávaním zrelých erytrocytov na mikrojadrách. Prianalýze sklíčok by podiel nezrelých erytrocytov

na celkovom počte erytrocytov nemal byť menej ako 20 % kontrolnej hodnoty. Ak podávanie trvá bez prestávky štyri a viac týždňov, na výskyt mikrojadier sa počíta minimálne 2 000 zrelých erytrocytov na jedno zviera. Systémy na automatickú analýzu (vizuálna analýza a toková cytometrická analýza bunkových suspenzií) sú prijateľnou alternatívou manuálneho hodnotenia, ak sa príslušne zdôvodnia a potvrdia.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa jednotlivo uvádza počet nezrelých erytrocytov, počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov a podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov. Ak podávanie prebieha bez prestávky štyri a viac týždňov, udávajú sa tiež údaje o zrelých erytrocytoch, ak sa zhromažďovali. Pre každé zviera sa udáva podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov a, ak je to vhodné, percentuálny podiel mikronukleovaných erytrocytov. Ak neexistujú dôkazy o rozdieloch medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (18) (19). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu mikrojadier naznačujú, že určitá látka vyvoláva mikrojadrá, ktoré sú výsledkom chromozómového poškodenia alebo poškodenia mitotického aparátu

v erytroblastoch testovaného druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka v nezrelých erytrocytoch testovaného druhu mikrojadrá nevytvára.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča.

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava, atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie spôsobu podávania,

— metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramov podávania a odoberania vzoriek,

— metódy prípravy sklíčok,

— metódy merania toxicity,

— kritériá počítania mikronukleovaných nezrelých erytrocytov,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky

— známky toxicity,

— podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov,

— počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov jednotlivo pre každé zviera,

— +/- stredná hodnota štandardnej odchýlky mikronukleovaných nezrelých erytrocytov na skupinu,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— použité štatistické analýzy a metódy,

— údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **LITERATÚRA**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, s. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, s. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. a Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.*, 123, s. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. a Heddle, J. A. (1990), The *In vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, s. 29-80.

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. a Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell a T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. a Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, s. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. a Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol* 14, s. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, s. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, *Mutation Res.*, 278, s. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol Recommended for the Short-term Mouse Peripheral Blood Micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, s. 53-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr., F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Soutou, S. a Vannier, B. (1994), *in vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, s. 293-304.

(12) Higashikuni, N. a Soutou, S. (1995), An Optimal Generalised Sampling Time of 30 ± 6 h after Double Dosing in the Mouse Peripheral Micronucleus Test, *Mutagenesis*, 10, s. 313-319.

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

(14) Hayashi, M., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, s. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. a Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, s. 269-275.

(16) Romagna, F. a Staniforth, C. D. (1989), The Automated Bone Marrow Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 213, s. 91-104.

(17) Gollapudi, B. a McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, s. 97-99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., Bootman, J. a Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised*, Cambridge Uniersity Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K., (1989) Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in:D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenecity test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, D. J. Kirkland (ed), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Mellbourne, Sydney, s. 184-232.“

PRÍLOHA 4D

„B13/14 MUTAGÉNNOSŤ — BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 471, bakteriálneho testu reverzných mutácií (1997).

1.1. ÚVOD

Bakteriálny test reverzných mutácií používa aminokyseliny vyžadujúce kmene *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* na zistenie bodových mutácií, ktoré zahŕňajú nahradenie, pridanie alebo vymazanie jednej alebo niekoľkých bázových párov DNA (1) (2) (3). Princípom bakteriálneho testu reverzných mutácií je, že zisťuje mutácie, ktoré vracajú do pôvodného stavu mutácie prítomné v testovacích kmeňoch a obnovujú funkčnú schopnosť baktérií syntetizovať esenciálne aminokyseliny. Reverzné baktérie sa zisťujú prostredníctvom ich schopnosti rásť za neprítomnosti aminokyseliny vyžadovanej rodičovským testovacím kmeňom.

Bodové mutácie sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy, že bodové mutácie onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a pokusných zvierat. Bakteriálny test reverzných mutácií je rýchly, lacný a relatívne ľahko uskutočniteľný. Mnohé z testovacích kmeňov majú viacero vlastností, ktoré spôsobujú ich väčšiu citlivosť na zistenie mutácií vrátane reaktívnych DNA sekvencií na reverzných miestach, zvýšenej bunkovej permeability na veľké molekuly a eliminácie opravných systémov DNA alebo zlepšenia opravných procesov DNA náchylných na chyby. Špecifickosť testovacích kmeňov môže poskytnúť užitočné informácie o typoch mutácií, ktoré sú vyvolané genotoxickými činiteľmi. Dostupná je veľká databáza výsledkov pre rôzne štruktúry pre bakteriálny test reverzných mutácií a boli vyvinuté dobré metódy na testovanie chemikálií s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, vrátane prchavých zmesí.

Pozri tiež všeobecný úvod, časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Test reverzných mutácií buď v *Salmonella typhimurium* alebo *Escherichia coli* zisťuje mutáciu v kmeni vyžadujúcom aminokyselinu (histidín alebo tryptofán) na vytvorenie kmeňa nezávislého od vonkajšieho prívodu aminokyseliny.

Substitučné mutagény bázového páru sú činiteľmi, ktoré spôsobujú bázovú zmenu DNA. V teste reverzných mutácií sa môže táto zmena odohrať na mieste pôvodnej mutácie alebo na inom mieste bakteriálneho genómu.

Konštrukčné mutagény sú činiteľmi, ktoré spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých bázových párov DNA, čím menia čítaciu konštrukciu DNA.

1.3. ÚVODNÉ ÚVAHY

Bakteriálny test reverzných mutácií využíva prokaryotické bunky, ktoré sa od buniek cicavcov odlišujú vo faktoroch ako vstrebávanie, metabolizmus, chromozómová štruktúra a opravné procesy DNA. Testy uskutočnené *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. *In vitro* systémy metabolickej aktivácie nemôžu plne napodobniť *in vivo* podmienky cicavcov. Test preto neposkytuje priame informácie o mutagénnej a karcinogénnej potencii látky u cicavcov.

Bakteriálny test reverzných mutácií sa bežne používa ako počiatočný prieskum génologickej aktivity a najmä aktivity vyvolávajúcej bodové mutácie. Rozsiahla databáza ukázala, že mnohé chemikálie, ktoré sú v tomto teste pozitívne, tiež vykazujú mutagénnu aktivitu v iných testoch. Existujú príklady mutagénnych činiteľov, ktoré nie sú zistené týmto testom; príčina týchto chýb sa dá pripísať špecifickej povahe

zisteného stavu, rozdielom v metabolickej aktivácii alebo rozdielom v biodostupnosti. Na druhej strane faktory, ktoré zvyšujú citlivosť bakteriálneho testu reverzných mutácií, môžu viesť k preceneniu mutagénnej aktivity.

Bakteriálny test reverzných mutácií nemusí byť vhodný pre hodnotenie určitých tried chemikálií, napríklad vysoko baktericídnych zlúčenín (napríklad: určitých antibiotík) a tých, o ktorých sa predpokladá (alebo je o nich známe), že špecificky narušujú replikačný systém buniek cicavcov (napríklad: niektoré inhibítory topoizomerázy a niektoré nukleozidové napodobeniny). V takýchto prípadoch sú vhodnejšie testy mutácií u cicavcov.

Hoci mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú karcinogénmi u cicavcov, korelácia nie je absolútna. Závisí to od triedy chemikálie a existujú karcinogény, ktoré týmto testom nie sú zistené, pretože pôsobia prostredníctvom iných negénotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Suspenzie bakteriálnych buniek sú vystavené testovacej látke za prítomnosti a neprítomnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Pri metóde použitia misiek sa tieto suspenzie zmiešajú s krycím agarom a umiestnia sa na veľmi malé médium. Pri metóde predinkubácie sa dávkovaná zmes inkubuje a potom zmieša s krycím agarom pred umiestnením na veľmi malé médium. Pri oboch technikách sa po dvoch alebo troch dňoch inkubácie spočítajú reverzné kolónie a porovnajú sa s počtom spontánnych kolónií revertantov na kontrolných miskách.

Boli popísané viaceré postupy uskutočnenia bakteriálneho testu reverzných mutácií. Medzi bežne používané patria metóda použitia misiek (1) (2) (3) (4), predinkubačná metóda (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuačná metóda (9) (10) a suspenzná metóda (11). Popísané boli aj modifikácie testovania plynov a pár (12).

Postupy popísané v tejto metóde sa týkajú najmä metódy použitia misky a predinkubačnej metódy. Obe sú prijateľné pre uskutočňovanie pokusov s metabolickou aktiváciou ij bez metabolickej aktivácie. Niektoré látky sa dajú efektívnejšie zistiť použitím predinkubačnej metódy. Tieto látky patria do tried chemikálií, ktoré zahŕňajú alifatické nitrozamíny s krátkymi reťazcami, bivalentné kovy, aldehydy, azo farbivá a diazozlúčeniny, pyrolizidínové alkaloidy, alylové zlúčeniny a nitrozlúčeniny (3). Zistilo sa, že niektoré triedy mutagénov nie sú vždy objavené použitím štandardných postupov, ako napríklad metódou použitia misky alebo predinkubačnou metódou. Tieto mutagény sa považujú za ‚osobitné prípady' a na ich zistenie sa dôrazne odporúča použitie alternatívnych postupov. Identifikované boli nasledovné ‚osobitné prípady' (spolu s príkladmi postupov, ktoré by sa dali použiť na ich zistenie): azo farbivá a diazozlúčeniny (3) (5) (6) (13), plyny a prchavé chemikálie (12) (14) (15) (16) a glykozidy (17) (18). Odchýlka od štandardného postupu sa musí vedecky zdôvodniť.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Prípravné práce**

1.5.1.1. *Baktérie*

Čerstvé kultúry baktérií sa nechajú vyrásť do neskorého exponenciálneho alebo skorého stacionárneho štádia rastu (približne 10^9 buniek na ml). Kultúry v neskorom stacionárnom štádiu sa nepoužívajú. Je dôležité, aby kultúry použité pri pokuse obsahovali vysoký podiel životaschopných baktérií. Podiel sa dá preukázať buď z minulých kontrolných údajov o rastových krivkách alebo pri každom pokuse prostredníctvom určenia počtu životaschopných buniek miskovým pokusom.

Odporúčaná inkubačná teplota je 37 °C.

Používa sa najmenej päť kmeňov baktérií. Tieto zahŕňajú štyri kmene *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 alebo TA97a alebo TA97; TA98; a TA100), ktoré boli v laboratóriách preukázateľne spoľahlivé a reproduktívne reaktívne. Tieto štyri kmene *S. typhimurium* majú GC bázové páry na primárnom reverznom mieste a je známe, že nemusia zistiť určité oxidujúce mutagény, medzispájacie činitele a hydrazíny. Takéto látky sa dajú zistiť pomocou kmeňov *E. coli* WP2 alebo *S. typhimurium* TA102 (19), ktoré majú AT bázu na primárnom reverznom mieste. Odporúčanou kombináciou kmeňov je preto:

— *S. typhimurium* TA 1535 a

— *S. typhimurium* TA 1537 alebo TA97a alebo TA97 a

— *S. typhimurium* TA98 a

— *S. typhimurium* TA100, a

— *E. coli* WP2 uvrA alebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) alebo *S. typhimurium* TA102.

Na zistenie spájacích mutagénov je vhodnejšie použiť TA102 alebo pridať kmeň *E. coli* (napríklad: *E. coli* WP2 alebo *E. coli* WP2 (pKM101)), ktorý dokonale opravuje DNA.

Na prípravu kultúr, overovanie bunkových znakov a uskladnenie sa používajú overené postupy. Požiadavka na aminokyselinu pre rast sa preukazuje pre každý prípravok zmrznutej kultúry (histidín pre kmene S. typhimurium a tryptofán pre kmene E. coli). Podobným spôsobom sa overujú iné fenotypové charakteristiky, menovite: ak je potrebná prítomnosť alebo neprítomnosť R-faktorových plazmidov (napríklad: odolnosť proti ampicilínu v kmeňoch TA98, TA100 a TA97a alebo TA97, WP2 uvrA aleboWP2 uvrA (pKM101) a odolnosť proti ampicilínu a tetracyklínu v kmeni TA102); prítomnosť charakteristických mutácií (t. j. rfa mutácia *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na kryštálovo fialovú a uvrA mutáciu *E. coli* alebo uvrB mutáciu *S. tyhimurium* prostredníctvom citlivosti na ultrafialové svetlo) (2) (3). Kmene by tiež mali dosahovať spontánne počty revertantných kolónií v rámci frekvenčných rozsahov očakávaných podľa historických kontrolných údajov laboratória, najlepšie v rozsahu uvedenom v literatúre.

1.5.1.2. *Médium*

Používa sa vhodné minimálne množstvo agaru (napríklad: obsahujúci Vogel-Bonnerovo minimálne médium E a glukózu) a krycí agar obsahujúci histidín a biotín alebo tryptofán umožňujúci malý počet delení buniek (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolická aktivácia*

Baktérie sa vystavia testovacej látke za prítomnosti i za neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9) pripravená z pečene hlodavcov ošetrených prípravkami na indukciu enzýmov ako napríklad Aroclorom 1254 (1) (2) alebo kombinácia fenobarbitonu a beta-naftoflavónu (18) (20) (21). Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentrácii v rozsahu od 5 do 30 % v/v v zmesi S9. Výber a stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie. Pre azo farbivá a diazo zmesy je vhodnejšie použiť redukčný systém metabolickej aktivácie (6) (13).

1.5.1.4. *Testovacia látka/prípravok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a ak je to potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním baktériám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9 (22). Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní látok vo vode nestabilných by organické rozpúšťadla nemali obsahovať vodu.

1.5.2. **Podmienky testov**

1.5.2.1. *Testovacie kmene* (pozri 1.5.1.1.)

1.5.2.2. **Koncentrácie dávok**

Medzi kritériá, ktoré je potrebné brať do úvahy pri stanovovaní najvyššieho množstva použitej testovacej látky, patria cytotoxicita a rozpustnosť v konečnej zmesi.

Je užitočné stanoviť toxicitu a nerozpustnosť při predbežnom pokuse. Cytotoxicita sa dá zistiť redukciou v množstve revertantných kolónií, vyjasnením alebo redukciou pozadia, alebo stupňom prežitia ošetrených kultúr. Cytotoxicita látky sa môže meniť za prítomnosti systémov metabolickej aktivácie. Nerozpustnosť by sa mala určiť ako vyzrážanie v konečnej zmesi za skutočných podmienok testu a musí byť viditeľná voľným okom.

Odporúčaná maximálna testovacia koncentrácia rozpustných necytotoxických látok je 5 mg/miska alebo 5 µl/miska. V prípade necytotoxických látok, ktoré nie sú rozpustné pri 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, má byť v konečnej zmesi nerozpustná jedna alebo viac testovaných koncentrácií. Testované látky, ktoré sú cytotoxické už pod 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, sa majú testovať až po cytotoxickú koncentráciu. Zrazenina by nemala prekážať vyhodnoteniu.

Malo by sa použiť aspoň päť rôznych analyzovateľných koncentrácií testovanej látky s intervalmi približne pol log (t. j. Ö10) medzi testovanými miestami v počiatočnom experimente. Menšie intervaly môžu byť vhodné vtedy, ak sa skúma vzťah koncentrácia/reakcia. Je možné zvážiť testovanie nad koncentráciu 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, ak sa vyhodnocujú látky obsahujúce významné množstvá potenciálne mutagénnych nečistôt.

1.5.2.3. **Negatívne a pozitívne kontroly**

Pri každej skúške sa zahrnú súbežne podľa kmeňa špecifické pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné kultúry, a to s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Koncentrácie pri pozitívnych kontrolných kultúrach sa volia tak, aby pri každej skúške vykazovali efektívny výkon.

Pri pokusoch s použitím systému metabolickej aktivácie sa referenčné látky pozitívnej kontrolnej kultúry vyberajú na báze použitého typu bakteriálnych kmeňov.

Nasledujúce látky sú príkladmi látok vhodných pre pozitívne kontrolné kultúry pri pokusoch s metabolickou aktiváciou.

Látka	č. CAS	č. Einecs
9,10-dimetylanthracén	781–43–1	212–308–4
7,12-dimetylbenz[a]anthracén	57–97–6	200–359–5
benzo[a]pyrén	50–32–8	200–028–5
2-aminoantracén	613–13–8	210–330–9
cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
monohydrát cyklofosfamidu	6055–19–2	

Nasledujúca látka je vhodnou pre pozitívne kontrolné kultúry pri metóde redukčnej metabolickej aktivácie:

Látka	č. CAS	č. Einecs
Congo Red (červeň Congo)	573–58–0	209–358–4

2-Aminoantracén by nemal byť jediným indikátorom efektívnosti zmesi S9. Ak sa používa 2-aminoantracén, každá dávka S9 by tiež mala byť charakterizovaná mutagénom, ktorý vyžaduje metabolickú aktiváciu mikrozomálnymi enzýmami, napríklad: benzo[a]pyrén, dimetylbenzantracén.

Nasledovné látky sú príkladmi pozitívnych kontrolných kultúr podľa kmeňov pre skúšky bez exogénneho systému metabolickej aktivácie:

Látka	č. CAS	č. Einecs	Kmeň
azid sodný	26628–22–8	247–852–1	TA 1535 a TA 100
2-nitrofluorén	607–57–8	210–138–5	TA98
9-aminoakridín	90–45–9	201–995–6	TA 1537, TA97a a TA97 a
ICR 191	17070–45–0	241–129–4	TA 1537, TA97a a TA97 a
kumén hydroperoxid	80–15–9	201–254–7	TA102
mitomycin C	50–07–7	200–008–6	WP2 uvrA a TA102
N-etyl-N-nitro-N-nitrozguanidín	70–25–7	200–730–1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
4-nitrochinolín-1oxid	56–57–5	200–281–1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
furylfuramid (AF2)	3688–53–7		kmene obsahujúce plazmid

Pre pozitívne kontrolné kultúry sa môžu použiť aj ďalšie vhodné referenčné látky. Podľa dostupnosti sa zváži použitie chemikálií príbuzných triede chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu.

Použijú sa tiež negatívne kontrolné vzorky pozostávajúce len z rozpúšťadla alebo nosiča, bez testovacej látky a inak ošetrované rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny. Používajú sa aj neošetrené kontrolné vzorky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne účinky.

1.5.3. **Postup**

Pri metóde s použitím misiek (1) (2) (3) (4) bez metabolickej aktivácie sa zvyčajne zmieša 0,05 ml alebo 0,1 ml testovacích roztokov, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry (obsahujúcej približne 10^8 životaschopných buniek) a 0,5 ml sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Pri skúške s metabolickou aktiváciou sa zvyčajne zmieša 0,5 ml roztoku metabolickej aktivácie obsahujúci vhodné množstvo postmitochondriálnej frakcie (v rozmedzí od 5 % do 30 % v/v v roztoku na metabolickú aktiváciu) s krycím agarom (2,0 ml), s baktériami a testovacou látkou/testovacím roztokom. Obsah oboch skúmaviek sa zmieša a vyleje sa na povrch veľmi malej agarovej misky. Krycí agar sa pred inkubáciou nechá vytvrdnúť.

Pri predinkubačnej metóde (2) (3) (5) (6) sa testovacia látka/testovací roztok predinkubuje s testovacím kmeňom (obsahujúcim približne 10^8 životaschopných buniek) a sterilným tlmiacim roztokom alebo systémom metabolickej aktivácie (0,5 ml) zvyčajne na 20 minút alebo viac pri teplote 30-37 °C pred zmiešaním s krycím agarom a vyliatím na povrch veľmi malej agarovej misky. Zvyčajne sa mieša 0,05 alebo 0,1 ml testovacej látky/testovacieho roztoku, 0,1 ml baktérií a 0,5 ml zmesi S9 alebo sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Skúmavky sa počas predinkubácie vetrajú použitím miešadla.

Pri každej úrovni dávok sa kvôli primeranému odhadu variácie používajú tri misky. Použitie dvoch misiek je prijateľné s vedeckým zdôvodnením. Občasná strata misky pokus neznehodnocuje.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú vhodnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzatvorených nádobách (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Inkubácia

Vdanom pokuse sa misky inkubujú pri teplote 37 °C počas 48-72 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby sa zráta počet revertantných kolónií na misku.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa uvádzajú ako počet revertantných kolónií na misku. Udáva sa tiež počet revertantných kolónií pri negatívnych (kontrola rozpúšťadlom a bez ošetrenia, ak boli použité) a pozitívnych kontrolných kultúrach. Jednotlivé počty na miskách, stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka sa uvádzajú pre testovaciu látku aj pre pozitívne a negatívne kontrolné kultúry (bez ošetrenia a/alebo s rozpúšťadlom).

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasných pozitívnych reakcií. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, sa poskytne zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch. Parametre štúdie, ktoré sa dajú modifikovať, zahŕňajú rozsahy koncentrácií, metódu aplikácie látky (použitie misky alebo kvapalná predinkubácia) a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast oproti testovanému rozsahu spojený s koncentráciou a/alebo reprodukovateľný nárast pri jednej alebo viacerých koncentráciách počtu revertantných kolónií na misku v najmenej jednom kmeni so systémom metabolickej aktivácie alebo bez systému metabolickej aktivácie (23). Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (24). Štatistická významnosť však nie je jediným určujúcim faktorom pozitívnej reakcie.

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky bakteriálneho testu reverzných mutácií naznačujú, že určitá látka vyvoláva bodové mutácie prostredníctvom základných substitúcií alebo konštrukčných posunov genómu *Salmonella typhimurium* a/alebo *Escherichia coli*. Negatívne výsledky naznačujú, že testovacia látka nie je v testovacích podmienkach pre testované druhy mutagénna.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Kmene:

— použité kmene,

— počet buniek v kultúre,

— charakteristiky kmeňa.

Podmienky testov:

— množstvo testovacej látky na misku (mg/miska alebo µl/miska) so zdôvodnením voľby dávky a počtu misiek na koncentráciu,

— použité médiá,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie, vrátane kritérií prijateľnosti,

— postupy dávkovania.

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky zrážania,

— počty na jednotlivých miskách,

— stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli uskutočnené,

— súbežné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach,

— s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach,

— s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

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

(2) Maron, D. M. a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. a Zeiger, E. (1994) Recommendations for the Perfomance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, s. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. a Ray, V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, s. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. a Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer letters* 1, s. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. a Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Test, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth, K. H. a Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. a Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cmabridge University Press, s. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. a Porchet, L. (1987), Liquid Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, s. 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. a Bridges, B. A. (1976), Use of a Simplified Fluctuation Test to Detect Low Levels of Mutagens, *Mutation Res.*, 38, s. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. a Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2. vydanie, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. a Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141-161.

(11) Thomson, E. D. a Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, s. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. a Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, s. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D a Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, s. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. a Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals (Testy mutagénnosti samonelly, výsledky testovania 311 chemikálií), *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, s. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. a Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in: *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges a F. Soebels (eds), Elsevier, Amsterdam, s. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. a Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, s. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. a Sugimura, T. (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cyasin and Synthetic Metylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, s. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. a Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, s. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., a Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia Coli* WP2 Tester Strains, *Mutagenesis*, 5. s. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis testing*, de Serres a kol. (eds), Elsevier, North Holland, s. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D. Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. a Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, s. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K, Nestmann, E. a Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, s. 83-91.

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. a Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part II, Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, Cambridge, s. 28-65.“

PRÍLOHA 4E

„B.17 MUTAGÉNNOSŤ — *IN VITRO* TEST MUTÁCIÍ GÉNOV BUNIEK CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou OECD TG 476, *in vitro* test mutácií génov buniek cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vitro test mutácií génov buniek cicavcov sa používa na zistenie mutácií vyvolaných chemickými látkami. Vhodné bunkové línie zahŕňajú L5178Y lymfómové (*lymphoma*) bunky myší, CHO, CHO-AS52 a V79 línie buniek čínskych morčiat a TK6 lymfoblastoidné bunky ľudí.(1). V týchto bunkových líniách najbežnejšie používané genetické merania merajú mutácie na timidínovej kináze (TK) a hypoxantino-guanínovej fosforibosilovej transferáze (HPRT) a transgén xantínovo-guanínovej fosforibozylovej transferáze (XPRT). Testy mutácií TK, HPRT a XPRT zisťujú rôzne spektrum genetických udalostí. Autozomálna poloha TK a XPRT môže umožňovať zistenie genetických udalostí (napríklad: veľké vymazania), nezistené v mieste HPRT na X chromozómoch (2)(3)(4)(5)(6).

V *in vitro* teste mutácií génov buniek cicavcov sa používajú kultúry ujatých bunkových línií alebo bunkových kmeňov. Použité bunky sa vyberajú na základe rastovej schopnosti kultúry a stability frekvencie spontánnych mutácií.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky *in vivo* cicavcov. Je potrebná opatrnosť pri vyhýbaní sa podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť. Pozitívne výsledky, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť, môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (7).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zmesi, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak neexistuje dokonalá korelácia medzi týmto testom a karcinogénnosťou. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je stále viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom odlišných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií (6).

Pozri tiež všeobecný úvod, časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Predná mutácia: génová mutácia z rodičovského typu mutantných foriem, ktorá umožňuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity funkcie kódovaného proteínu.

Mutagény substituujúce bázové páry: látky, ktoré spôsobujú substitúciu jedného alebo viacerých bázových párov v DNA.

Konštrukčné mutagény: sú činiteľmi, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých základných párov.

Doba fenotypického prejavu: obdobie, počas ktorého sú nezmenené génové produkty vyčerpané z novomutovaných buniek.

Mutačná frekvencia: pozorovaný počet mutantných buniek delený počtom životaschopných buniek.

Relatívny celkový rast: zvýšenie počtu buniek v čase v porovnaní s kontrolnou populáciou buniek; vypočítava sa ako výsledok rastu suspenzie v pomere k času negatívnej kontrolnej kultúry krát klonovacia efektívnosť v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Relatívny suspenzný rast: zvýšenie počtu buniek v porovnaní s časom prejavu v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Životaschopnosť: klonovacia efektívnosť ošetrených buniek v čase umiestnenia na misky v selektívnych podmienkach po čase prejavu.

Prežitie: klonovacia efektívnosť ošetrených buniek pri umiestnení na misky na konci doby podávania; prežitie sa obyčajne vyjadruje v pomere k prežitiu populácie kontrolných buniek.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunky s nedostatkom tymidínovej kinázy (TK) z dôvodu mutácie $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ sú odolné voči cytotoxickým účinkom pyrimidínovej obdoby trifluorothymidínu (TFT). Bunky s dostatkom tymidínovej kinázy sú citlivé na TFT, ktorý spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Tieto mutantné bunky sú schopné rozširovať sa za prítomnosti TFT, zatiaľ čo normálne bunky, ktoré obsahujú tymidínovú kinázu, nie sú. Podobne aj bunky s nedostatkom HPRT alebo XPRT sa vyberajú podľa odolnosti voči 6-thioguanínu (TG) alebo 8-azaguanínu (AG). Vlastnosti testovacej látky je potrebné zvážiť v prípadoch, keď sa bázová obdoba alebo zlúčenina príbuzná so selektívnym činidlom testujú v akýchkoľvek testoch mutácií génov buniek cicavcov. Potrebné je napríklad preskúmať akúkoľvek predpokladanú selektívnu toxicitu testovacej látky pre mutantné a nemutantné bunky. Pri testovaní chemikálií štrukturálne príbuzných so selektívnym činidlom je preto nutné overiť výkon selektívneho systému/činidla.(8).

Bunky v suspenzii alebo jednovrstvovej kultúre sa vystavia testovacej látke s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie na vhodnú dobu a subkultivujú sa na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypického prejavu pred mutantnou selekciou (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxicita sa zvyčajne stanovuje meraním relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr po dobe podávania. Ošetrené kultúry sa vhodnú dobu, charakteristickú pre každý vybraný lokus a typ buniek, udržiavajú v rastovom médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypický prejav indukovaných mutácií. Mutačná frekvencia sa stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných buniek a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej efektívnosti (životaschopnosti). Po vhodnej inkubačnej dobe sa kolónie zrátajú. Mutačná frekvencia sa odvodzuje od počtu mutantných kolónií v selektívnom médiu a počtu kolónií v neselektívnom médiu.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. Prípravné práce

1.4.1.1. *Bunky*

Pre použitie v tomto teste sú dostupné rôzne bunkové typy, vrátane subklonov buniek L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 alebo TK6. Typy buniek použité v tomto teste majú preukázanú citlivosť na chemické mutagény, vysokú klonovaciu efektívnosť a stabilnú frekvenciu spontánnych mutácií. Bunky sa kontrolujú na kontamináciu mykoplazmou a pri jej zistení sa nepoužívajú.

Test by sa mal formulovať tak, aby mal vopred určenú citlivosť a silu. Počet použitých buniek, kultúr a koncentrácií testovacej látky odráža tieto definované parametre (14). Minimálny počet životaschopných buniek, ktoré prežijú podávanie a ktoré sa použijú

v každom štádiu testu, je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným pravidlom je použiť počet buniek, ktorý je najmenej 10-krát taký veľký, ako prevrátená hodnota frekvencie spontánnych mutácií. Odporúča sa však použiť najmenej 10^6 buniek. Na znázornenie konzistentného výkonu testu by mali byť dostupné historické údaje o použitom systéme buniek

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Používajú sa príslušné médiá a inkubačné podmienky (nádoby, koncentrácia CO_2, teplota a vlhkosť). Médiá sa vyberajú podľa selektívnych systémov a typu buniek použitých počas testu. Osobitne dôležité je zvoliť podmienky kultúr tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas obdobia prejavu a schopnosť formovania kolónií mutantných aj nemutantných buniek.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Bunky sa odoberajú z kultúr vysadených v médiu a inkubovaných pri teplote 37 °C. Pred použitím v tomto teste sa kultúry podľa potreby prečistia od existujúcich mutantných buniek.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sa vystavia testovacej látke za prítomnosti aj za neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9) pripravená z pečene hlodavcov a ošetrená prípravkami na indukciu enzýmov ako napríklad Aroclorom 1254 (15) (16) (17) (18) alebo kombinácia fenobarbitonu a beta-naftoflavónu (19) (20).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1-10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Výber a stav systému metabolickej aktivácie závisí od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

Množstvo situácií, vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy, môže poskytnúť potenciál pre endogénnu aktiváciu. Výber použitých bunkových línií sa vedecky zdôvodňuje (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzýmu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Príprava testovacej látky*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozrieďujú, ak je to potrebné pred ošetrením buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrením. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní látok vo vode nestálych by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu je možné odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. *Koncentrácie*

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patria cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolkou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse s použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu. Užitočné je stanovenie cytotoxicity a rozpustnosti v predbežnom pokuse.

Používať by sa mali najmenej štyri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie sú oddelené nie viac ako jedným koeficientom medzi 2 a $\sqrt{10}$. Ak je najvyššia koncentrácia založená na cytotoxicite, jej výsledkom je približne 10-20 % (avšak nie menej ako 10 %) relatívneho prežitia (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívneho celkového rastu. Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 mg/ml, 5 µl/ml alebo 1,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

Relatívne nerozpustné látky sa testujú po limit rozpustnosti v podmienkach kultúry. V konečnom médiu, ktorému sú bunky vystavené, sa stanovujú dôkazy nerozpustnosti. Užitočné je odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu vystavenia v testovacom systéme kvôli prítomnosti buniek, séra S9, atď. Nerozpustnosť sa zisťuje voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Kontrolné kultúry*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadla alebo nosiča) kontrolné kultúry s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie by pozitívna kontrolná kultúra mala byť tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú kultúru:

Stav metabolickej aktivácie	Miesto	Látka	CAS č.	Einecs č.
neprítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	etylmetánsulfonát	62–50–0	200–536–7
		etylnitrozmočovina	759–73–9	212–072–2
	TK (malé a veľké kolónie)	metylmetánsulfonát	66–27–3	200–625–0
	XPRT	etylmetánsulfonát	62–50–0	200–536–7
		etylnitrozmočovina	759–73–9	212–072–2
prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	3-metylcholanthrén	56–49–5	200–276–4
		N-nitrozodimetylamín	62–75–9	200–549–8
		7,12-dimetylbenzanthracén	57–97–6	200–359–5
	TK (malé a veľké kolónie)	cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
		monohydrát cyklofosfamidu	6055–19–2	
		benzo[a]pyrén	50–32–8	200–028–5
		3-metylcholanthén	56–49–5	200–276–5
	XPRT	N-nitrozodimetylamín (pre vysoké dávky S9)	62–75–9	200–549–8
		benzo[a]pyrén	50–32–8	200–028–5

Na pozitívnu kontrolnú kultúru sa môžu použiť aj iné vhodné látky, napríklad: ak laboratórium má historickú databázu o 5-bromo 2'-deoxyuridíne (CAS č. 59–14–3, Einecs č. 200–415–9), použije sa aj táto referenčná látka. Podľa dostupnosti sa tiež zváži použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede príbuzných chemikálií.

Použijú sa negatívne kontrolné kultúry, pozostávajúce iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu, a ošetrené rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry. Použijú sa aj neošetrené kontrolné kultúry, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne efekty.

1.4.3. Postup

1.4.3.1. *Podávanie testovacej látky*

Rozširujúce sa bunky sa exponujú testovacej látke s metabolickou aktivácou i bez metabolickej aktivácie. Exponovanie trvá vhodnú dobu (efektívnych je zvyčajne 3-6 hodín). Doba expozície sa môže predĺžiť počas jedného alebo viacerých bunkových cyklov.

Pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť duplicitné alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Pri použití jednotlivých kultúr sa počet koncentrácií zvýši na zabezpečenie primeraného počtu kultúr na analýzu (napríklad: minimálne 8 analyzovateľných koncentrácií). Používajú sa duplicitné negatívne (s rozpúšťadlom) kontrolné kultúry

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzavretých nádobách (21)(22).

1.4.3.2. *Meranie prežitia, životaschopnosti a mutačnej frekvencie*

Na konci expozičného obdobia sa bunky očistia a kultivujú na stanovenie prežitia a na umožnenie prejavu mutantného fenotypu. Meranie cytotoxicity stanovením relatívnej klonovacej frekvencie (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr sa zvyčajne uskutoční po dobe podávania.

Každé miesto má definovanú požiadavku na minimálnu dobu na umožnenie takmer optimálneho fenotypického prejavu novoindukovaných mutantov (HPRT a XPRT vyžadujú najmenej 6-8 dní a TK najmenej dva dni). Bunky rastú v médiu so selektívnym činiteľom aj bez selektívneho činiteľa/činiteľov na stanovenie počtu mutantov a klonovacej efektívnosti. Meranie životaschopnosti (používa sa na výpočet mutačnej frekvencie) sa uskutočňuje na konci obdobia prejavu umiestnením na misky s neselektívnym médiom.

Ak je testovacia látka v L5178Y TK $^{+/-}$ teste pozitívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční minimálne na jednej testovanej kultúre (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnycha pozitívnych kontrolných kultúrach. Ak je testovacia látka v L5178Y TK $^{+/-}$ teste negatívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Meranie kolónií sa tiež môže uskutočniť pri štúdiách používajúcich TK6TK$^{+/-}$.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje zahŕňajú stanovenie cytotoxicity a životaschopnosti, počet kolónií a mutačné frekvencie pre ošetrované a kontrolné kultúry. V prípade pozitívnej reakcie v teste L5178TK$^{+/-}$ sa kolónie hodnotia použitím kritérií malých a veľkých kolónií na najmenej jednej koncentrácii testovacej látky (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Podrobne bola preskúmaná molekulárna a cytogenetická povaha veľkých a malých kolónií mutácií (23)(24). V teste TK$^{+/-}$ sa kolónie hodnotia použitím kritérií pre kolónie s normálnym rastom (veľké) a pomalým rastom (malé) (25). Mutantné bunky, ktoré utrpeli najväčšie genetické poškodenie, majú predĺžené časy delenia, a preto tvoria malé kolónie. Toto poškodenie je zvyčajne v rozsahu od straty celého génu po karyotypicky viditeľné chromozómové odchýlky. Vznik mutovaných malých kolónií sa spája s chemikáliami, ktoré indukujú veľké chromozómové odchýlky (26). Menej vážne ovplyvnené mutantné bunky rastú rýchlosťou podobnou ako rodičovské bunky a tvoria veľké kolónie.

Uvádza sa prežitie (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívny celkový rast. Mutačná frekvencia sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na počet prežitých buniek.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť z prípadu na prípad. V prípadoch, kedy sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, poskytne sa zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch a to buď pri nejasných alebo negatívnych výsledkoch. Parametre štúdie, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast mutačnej frekvencie. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vitro* testu mutácií génov buniek cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov. Najdôležitejšou je reprodukovateľná pozitívna reakcia na koncentráciu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča.

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— počet bunkových kultúr,

— počet bunkových prechodov, ak je to vhodné,

— metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné

— neprítomnosť mykoplazmy.

Podmienky testov:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite

— a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

— skladba média, koncentrácia CO_2,

— koncentrácia testovacej látky,

— objem nosiča a pridanej testovacej látky,

— inkubačná teplota,

— inkubačná doba,

— trvanie podávania,

— hustota buniek pri vysádzaní,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,

— dĺžka obdobia prejavu (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— selektívne činitele,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— definícia kolónií, hodnotí sa veľkosť a typ (vrátane kritérií na ‚malé' a ‚veľké', ak je to vhodné).

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky zrážania,

— údaje o pH a osmolalite počas vystavenia testovacej látke, ak sú stanovené,

— veľkosť kolónie, ak sa hodnotí, prinajmenšom pre negatívne a pozitívne kontrolné kultúry,

— primeranosť laboratória na zistenie malých mutantných kolónií so systémom L5178TK$^{+/-}$, ak je to vhodné,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— štatistické analýzy, ak existujú,

— súčasné údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,

— historické údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, modusmi a štandardnými odchýlkami,

— mutačná frekvencia.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. LITERATÚRA

(1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. a Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28, Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

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

(3) Liber, H. L. a Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, s. 467-485.

(4) Moore, M. M., Hrington-Brock, K., Doerr, C. L. a Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, s. 394-403.

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

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

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

(8) Clive, D., McCuen, R. Spector, J. F. S., Piper, C. a Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, s. 225-251.

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

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. a Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxantine Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, s. 135-141.

(11) Liber., H. L., Yandell, D. W. a Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells:Quantitative Differences Are due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, s. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R. a Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methansulphonate — and ICR 191 — Induced Molecular Analyses of Ethyl Methansulphonate — and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, s. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. a Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. a kol. (eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, s. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M, Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. a Asquith, S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based Upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambridge University Press, s. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. a Mazzaccori, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse Liver Microsome Activated Dimetylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, s. 365-373.

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

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. a Brown, M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/$TK^{+/-}$ — Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutation Res.*, 59, s. 61-108.

(18) Maron, D. M. a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, s. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. a Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North Holland, s. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. a McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, s. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. a Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, s. 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. a Hozier, J. C. (1990) Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thimidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, s. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. a Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifuoronthymidine Resistant (TFT^{+}) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ — Mouse Lymphoma Cells (Analýza mutantov L5178Y/$TK^{+/-}$ — lymfómových buniek myší rezistentných voči trifluoronthymidínu, *Mutation Res.*, 151, s. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. a Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a heterozygous Atosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, s. 89-102.

(26) Moore, M. M. a Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK- Deficient Mutant Frequency in L5178Y/$TK^{+/-}$ — 3.7.2 C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, s. 609-614.“

PRÍLOHA 4F

„**B.23 TEST SPERMATOGONÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto metóda je obdobou OECD TG 483, testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať látky, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v spermatogonálnych bunkách cicavcov (1) (2) (3) (4)(5). Štrukturálne chromozómové odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómového typu. Táto metóda nie je určená na meranie numerických odchýlok a na tento účel sa bežne nepoužíva. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb.

Tento test meria chromozómové udalosti v spermatogonálnych zárodočných bunkách, a preto sa predpokladá, že predpovedá vznik dedičných mutácií v zárodočných bunkách.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Tento *in vivo* cytogenetický test zisťuje chromozómové odchýlky v spermatogonálnych mitózach. Iné cieľové bunky tomuto testu nepodliehajú.

Na zistenie odchýlok chromatidového typu v spermatogonálnych bunkách sa skúma prvé delenie mitotických buniek po podaní ešte pred tým, ako sa tieto lézie stratia v následných deleniach buniek. Dodatočné informácie z ošetrených spermatogonálnych kmeňových buniek sa získavajú analýzou meiotických chromozómov na odchýlky chromozómového typu pri diakinetickej metafáze I, keď sa ošetrené bunky stanú spermatocytmi.

Tento *in vivo* test skúma, či mutagény somatických buniek sú tiež aktívne v zárodočných bunkách. Spermatogonálny test je ďalej relevantný pre hodnotenie mutagénneho rizika tým, že umožňuje posúdenie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA.

V semenníkoch je prítomné množstvo generácií spermatogónií so spektrom citlivosti na chemické látky. Zistené odchýlky preto predstavujú celkovú reakciu vystavených populácií spermatogonálnych buniek s prevládajúcimi početnejšími diferencovanými spermatogonálnymi bunkami. Rôzne generácie spermatogónií sú alebo nie sú exponované všeobecnou cirkuláciou v závislosti od ich pozície v semenníkoch, kvôli fyzickej a fyziologickej bariére Sertoliho buniek a bariére krvi v semenníkoch.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a opätovné spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Trhlina: achromatická lézia menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Numerická odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou numerickou charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného chromozómového čísla n) odlišného od diploidného čísla (t. j. 3n, 4n, atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delenia a fragmenty, intrazmeny alebo interzmeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú exponované príslušným spôsobom testovacou látkou a utratené vo vhodnom čase po podaní látky. Pred utratením sa zvieratá ošetria prostriedkom zastavujúcim metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa zo zárodočných buniek urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a metafázové bunky sa analyzujú na chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. Prípravné práce

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Najbežnejšie sa používajú samce čínskych morčiat a myší. Použiť sa dajú samce iného vhodného druhu cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné rozrieďujú pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky na používaných úrovniach dávok Nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* v spermatogonálnych bunkách pri podaní na úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí.

Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich boli odoberané iba raz. Ak sú dostupné, môže sa zvážiť použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	č. CAS	č. Einecs
Cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
cyklohexamín	108–91–8	203–629–0
mitomycin C	50–07–7	200–008–6
monomerický akrylamid	79–06–1	201–173–7
trietylénmelamín	51–18–3	200–083–5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín, iba s rozpúšťadlom alebo nosičom, a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú jeden alebo dvakrát (t. j. ako jedno podanie alebo dve podania). Testovacie látky môžu byť podávané aj v dvoch dávkach, t. j. dve podania v jeden deň po niekoľkých hodinách po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

V skupine s najvyššou dávkou sa uskutočnia dva odbery vzoriek. Keďže kinetika bunkového cyklu môže byť ovplyvnená testovacou látkou, vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrení, prvýkrát skôr a druhýkrátneskôr, približne 24 a 48 hodín po podaní. Pre dávky prekračujúce najvyššiu dávku sa odber uskutoční po 24 hodinách alebo pri 1,5 násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po podaní, pokiaľ nie je známe, že pre zistenie účinkov je vhodnejší iný čas (6).

Vzorky sa môžu ďalej odoberať v iných časoch. Napríklad v prípade chemikálií, ktoré môžu indukovať zaostávanie chromozómov alebo vyvolávať účinky nezávislé od S, sú vhodné skoršie časy odberu vzoriek (1).

Vhodnosť opakovaného harmonogramu podávania sa identifikuje z prípadu na prípad. Po opakovanom harmonograme podávania sa zvieratá utratia po 24 hodinách (1,5 násobok dĺžky bunkového cyklu) od posledného podania. Kde je to vhodné, môžu sa uskutočniť ďalšie odbery vzoriek.

Pred utratením sa zvieratám injekčne intraperitoneálne podáva vhodná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napr Colcemid® alebo colchicin). Po vhodnom čase sa následne zo zvierat odoberajú vzorky. U myší je tento interval približne 3-5 hodín; u čínskych morčiat približne 4-5 hodín.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (7). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú, rsp. žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známka toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť.

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobí určité príznaky toxicity v spermatogonálnych bunkách (napríklad: zníženie pomeru spermatogonálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze; toto zníženie by nemalo presiahnuť 50 %).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednom objeme dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššieho objemu dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava chromozómov**

Ihneď po utratení sa získavajú bunkové suspenzie z jedného alebo oboch testov, ktoré sa vystavia hypotonickému roztoku a fixujú sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. **Analýza**

Od každého zvieraťa sa analyzuje najmenej 100 dobre rozšírených metafáz (t. j. minimálne 500 metafáz na skupinu). Tento počet je možné znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka, vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy fixácie často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote $2n \pm 2$.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek so štrukturálnymi chromozómovými odchýlkami a počet chromozómových odchýlok na bunku. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné skupiny. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok.

Ak je pozorovaná mitóza i meióza, pomer spermatogonálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze sa stanoví ako meranie cytotoxicity pre všetky pokusné a negatívne kontrolné zvieratá pri celkovej vzorke 100 deliacich sa buniek na jedno zviera s cieľom stanovenia možného cytotoxického účinku. Ak je pozorovaná len mitóza, mitotický index sa stanovuje pre najmenej 1 000 buniek na jedno zviera.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo zjavný nárast počtu buniek s odchýlkami pri jednej dávke pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (8). Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu. Nejednoznačné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka s výsledkami, ktoré nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu.

Pravdepodobnosť, že testovacia látka alebo jej metabolity dosiahnu cieľové tkanivo, je predmetom diskusie.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava, atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie času utratenia,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá pre hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— pomer buniek spermatogonálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze,

— typ a počet odchýlok uvádzaný samostatne na každé zviera,

— celkový počet odchýlok na skupinu,

— počet buniek s odchýlkami na skupinu,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— súčasné údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách, s rozsahmi, strednými hodnotami

— a štandardnými odchýlkami,

— súčasné údaje o pozitívnych kontrolných skupinách,

— zmeny ploidie, ak boli pozorované.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. LITERATÚRA

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to Their Cell Cycle Specificatios, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert, B. a Magnusson, J. (eds), Liss, New York, s. 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests In Mammals, in: *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, ed. S. Venitt a J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington D. C., s. 275-306.

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

(4) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G. a Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115-141.

(5) Yamamoto, K. a Kikuchi, Y. (1978), A new Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, s. 207-209.

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

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

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K., (1989) Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184-232.“

PRÍLOHA 4G

„B39 TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS — UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO*

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou OECD TG 486, testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis — UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis — UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* je identifikovať testovacie látky, ktoré indukujú opravu DNA v pečeňových bunkách pokusných zvierat (1) (2) (3) (4).

Tento *in vivo* test poskytuje metódu na skúmanie genotoxických účinkov chemikálií v pečeni. Meraným parametrom je dôkaz poškodenia DNA a následná oprava v pečeňových bunkách. Pečeň je zvyčajne hlavným miestom metabolizmu absorbovaných zmesí. Poškodenia DNA je preto vhodné merať *in vivo*.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Koncový bod neplánovanej syntézy DNA (UDS) sa meria stanovením absorpcie označených nukleozidov v bunkách, ktoré neprechádzajú plánovanou (S-fáza) syntézou DNA. Najpoužívanejšou technikou je stanovenie absorpcie trítiom označeného tymidínu (3H-TdR) autorádiografiou. Pre *in vivo* testy UDS sa používajú najmä krysie pečene. Použiť sa môžu aj iné ako pečeňové tkanivá, tie ale nie sú predmetom tejto metódy.

Zistenie UDS závisí od počtu báz DNA odstránených a nahradených na mieste poškodenia. Test UDS je preto osobitne hodnotný na zistenie ‚dlhej opravy' (20-30 báz) indukovanej látkou. ‚Krátka oprava' (jedna až tri bázy) sa naopak zisťuje s omnoho menšou citlivosťou. Z dôvodu neopravenia, nesprávnej opravy alebo nesprávnej replikácie lézií DNA môžu vzniknúť mutagénne udalosti. Rozsah reakcie UDS neposkytuje žiadny náznak kvality opravného procesu. Je ďalej možné, že mutagén reaguje s DNA, ale poškodenie DNA nie je opravené odstraňovacím opravným procesom. Nedostatok špecifických informácií o mutagénnej aktivite poskytnutý testom UDS je kompenzovaný potenciálnou citlivosťou tohto parametra, pretože sa meria na celom genóme.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Opravované bunky: čisté jadrové vlákno (net nuclear grain — NNG) vyššie ako stanovená hodnota, adjustuje sa v laboratóriu vykonávajúcom test.

Čisté jadrové vlákno (net nuclear grain — NNG): kvantitatívny ukazovateľ aktivity UDS buniek pri autorádiografických testoch UDS vypočítaný odpočítaním priemerného počtu cytoplazmatických vlákien v cytoplazmatických oblastiach ekvivalentných jadru (CG) od počtu jadrových vlákien (NG): NNG = NG — CG. Počty NNG sa vypočítavajú pre jednotlivé bunky a potom spočítavajú pre bunky v kultúre, v paralelných kultúrach, atď.

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): opravná syntéza DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test UDS s pečeňovými bunkami cicavcov naznačuje opravnú syntézu DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi. Test je zvyčajne založený na aplikácii 3H = TdR do pečeňových buniek DNA, ktoré majú nízku frekvenciu buniek v S-fáze bunkového cyklu. Absorpcia 3H = TdR sa zvyčajne stanovuje autorádiografiou, keďže táto metóda nie je tak citlivá na rušenie z buniek v S-fáze, ako napríklad počítanie kvapalnej scintilácie.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, hoci použiť sa dajú aj iné vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú a ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo, alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, kedykoľvek je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každej nezávisle uskutočňovanej časti pokusu sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívnym kontrolným skupinám sa podávajú látky, u ktorých je známa tvorba UDS pri podaní na úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva zistiteľný nárast proti pozadiu. Pozitívne kontrolné skupiny vyžadujúce metabolickú aktiváciu sa používajú pri dávkach vyvolávajúcich mierne reakcie (4). Dávky sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok pre pozitívne kontrolné skupiny:

Odber vzorky	Látka	č. CAS	č. Einecs
skorý odber (2-4 hodiny)	N-nitrozodimetylamín	62–78–9	200–249–8
neskorý odber (12-16 hodín)	N-2-fluorenylacetamid (2-AAF)	53–96–3	200–188–6

Pre pozitívne kontrolné skupiny sa môžu použiť aj iné vhodné látky. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Používa sa primeraný počet zvierat tak, aby bola zohľadnená prirodzená biologická variácia pri reakcii na test. Počet zvierat činí najmenej tri analyzovateľné zvieratá na skupinu. Ak existujú dostatočné historické údaje, pre súčasné negatívne a pozitívne kontrolné skupiny sa vyžaduje jedno alebo dve zvieratá.

Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov používajúce rovnaké spôsoby expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia, najlepšie samcov. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú jedenkrát.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Zvyčajne sa používajú minimálne dve úrovne dávok. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Vo všeobecnosti by najnižšia dávka mala byť 50 % až 25 % najvyššej dávky.

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii.

Najvyššia dávka sa definuje jako dávka, ktorá spôsobuje známky toxicity v pečeni (napríklad: pyknotické jadrá).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Intraperitoneálna cesta sa však neodporúča, pretože pečeň by mohla byť vystavená testovacej látke priamo a nie prostredníctvom obehového systému. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava pečeňových buniek**

Pečeňové bunky sa pripravujú z pokusných zvierat zvyčajne po 12 až 16 hodinách od podania. Vo všeobecnosti je potrebný aj ďalší odber vzorky (zvyčajne po dvoch až štyroch hodinách od podania dávky), pokiaľ neexistuje jasná pozitívna reakcia po 12 až 16 hodinách. Odber vzoriek sa môže uskutočniť aj v inom čase, ak je to zdôvodnené na základe toxikokinetických údajov.

Krátkodobé kultúry pečeňových buniek cicavcov sa zvyčajne tvoria perfúzovaním pečene in situ kolagenázou a umožnením čerstvo oddelených pečeňových buniek zachytiť sa na vhodnom povrchu. Pečeňové bunky z negatívnych kontrolných skupín zvierat by mali mať životaschopnosť (5) najmenej 50 %.

1.5.7. **Stanovenie UDS**

Čerstvo izolované pečeňové bunky cicavcov sa inkubujú s médiom obsahujúcim 3H-TdR primerane dlho, napríklad: tri až osem hodín. Na konci inkubačnej doby sa oddelí médium od buniek, pričom tieto môžu byť inkubované s médiom obsahujúcim nadbytočný neoznačený tymidín na zníženie neprirodzenej rádioaktivity (‚studený lov'). Bunky sa následne očistia, fixujú a nechajú vysušiť. Pri dlhších inkubačných časoch nie je studený lov potrebný. Sklíčka sa namočia do autorádiografickej emulzie, vystavia do tmy (napríklad: pri chladení počas 7 až 14 dní), vyvolajú, zafarbia a následne sa spočítajú exponované striebristé vlákna. Z každého zvieraťa sa pripravujú dve až tri sklíčka.

1.5.8. **Analýza**

Sklíčka obsahujú dostatočný počet buniek s normálnou morfológiou na umožnenie cieleného hodnotenia UDS. Preparáty sa mikroskopicky skúmajú na známky otvorenej cytotoxicity (napríklad: pyknóza, znížené hodnoty včlenenia rádioaktívnych alebo ťažkých izotopov).

Sklíčka sa pred rátaním vlákien označia kódmi. Z každého zvieraťa sa z minimálne dvoch sklíčok hodnotí 100 buniek; hodnotenie menej ako 100 buniek/zviera sa zdôvodní. Počty vlákien sa nehodnotia na S-fázové jadrá, avšak je možné zaznamenať podiel S-fázových buniek.

Množstvo aplikovaného 3H-TdR do jadra a cytoplazmy morfologicky normálnych buniek podľa rozloženia striebristých vlákien sa stanovuje vhodnou metódou.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Uvádzajú sa údaje za každé zviera a sklíčko. údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Počet čistých jadrových vlákien (NNG) sa vypočítava pre každú bunku, pre každé zviera a pre každú dávku a čas odpočítaním počtu CG od počtu NG. Ak sa počítajú ‚opravované bunky', kritériá pre definovanie ‚opravovaných buniek' sa zdôvodnia a založia na historických alebo súčasných údajoch o negatívnych kontrolných skupinách. Numerické výsledky sa môžu hodnotiť štatistickými metódami. Ak sa použijú štatistické testy, vyberajú sa a zdôvodňujú pred uskutočnením štúdie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Príklady kritérií pre pozitívne/negatívne reakcie zahŕňajú:

pozitívne	i)	hodnoty NNG nad stanovenou hranicou, ktorá je zdôvodnená na základe laboratórnych historických údajov;
alebo	ii)	hodnoty NNG oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny;
negatívne	i)	hodnoty NNG v rámci/pod historickou prahovou hodnotou kontrolnej skupiny;
alebo	ii)	hodnoty NNG nie oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny.

Zvažuje sa biologická relevantnosť výsledkov, t. j. do úvahy sa berú parametre ako variácia medzi zvieratami, vzťah medzi dávkou a reakciou a cytotoxicita. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu UDS s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* naznačujú, že testovacia látka vyvoláva poškodenie DNA v pečeňových bunkách *in vivo*, ktoré sa dajú opraviť neplánovanou synézou DNA *in vitro*. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje poškodenie DNA zistiteľné týmto testom.

Mala by sa prediskutovať pravdepodobnosť, že testovacia látka dosiahne všeobecnú obehovú sústavu alebo špecificky cieľové tkanivo (napríklad: systémová toxicita).

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava, atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,

— metódy overenia, že testovacia látka dosiahla všeobecnú obehovú sústavu alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— metóda prípravy pečeňových buniek a kultúr,

— použitá autorádiografická technika,

— počet pripravených sklíčok a počet hodnotených buniek,

— hodnotiace kritériá,

— kritériá hodnotenia pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— stredné hodnoty jadrových vlákien, cytoplazmatických vlákien a čistých jadrových vlákien podľa jednotlivých sklíčok, zvierat a skupín,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— známky toxicity,

— súčasné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách,

— s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— počet ‚opravovaných buniek', ak bol stanovený,

— počet buniek v S-fáze, ak bol stanovený,

— životaschopnosť buniek.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. a Penman, M. G., (1985), An Assessment of the *in vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, s. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J. Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. a Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, s. 123-133.

(3) Kennely, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. a Mitchell, I. de. G. (1993), *In vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland, D. J. a Fox, M. (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52-77.

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G. Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. a Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and *In vivo*, *Mutation Res.*, 312, s. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. a Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In vivo* / *In vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, s. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. a Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *in vivo*/*In vitro* hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ. Mutagen.*, 4, s. 553-562."

PRÍLOHA 5

VŠEOBECNÉ POŽIADAVKY NA KLASIFIKÁCIU A OZNAČOVANÍE NEBEZPEČNÝCH LÁTOK A PRÍPRAVKOV

Pozri smernicu Komisie 2001/59/ES, Ú. v. ES L 332, 28.12.2000, s. 81.

PRÍLOHA 6

„PRÍLOHA IX

ČASŤ A

Ustanovenia o detských uzáveroch

Okrem ustanovení článku 22 ods. 1 písm. e) tejto smernice, nádoby s akýmkoľvek objemom, ktoré obsahujú látky s rizikom vdýchnutia (Xn; R65) a klasifikované a označené podľa odseku 3.2.3. prílohy VI tejto smernice, s výnimkou látok uvedených na trh v podobe aerosólov alebo v nádobe so zapečateným sprejovým nástavcom, musia byť vybavené detským uzáverom.

1. *Uzatvárateľné balenia*

   Detské uzávery používané na uzatvárateľných baleniach musia vyhovovať ISO norme 8317 (vydanie z 1. júla 1989) vzťahujúcej sa na ‚Balenia odolné deťom — požiadavky a metódy testovania uzatvárateľných balení' prijatej Medzinárodnou organizáciou pre normy (ISO).

2. *Neuzatvárateľné balenia*

   Detské uzávery používané na neuzatvárateľných baleniach musia vyhovovať CEN norme EN 862 (vydanie z marca 1997) vzťahujúcej sa na ‚Balenie — Deťom odolné balenie — Požiadavky a testovacie metódy neuzatvárateľných balení pre nefarmaceutické výrobky' prijatej Európskym výborom pre štandardizáciu (CEN).

3. *Poznámky*

   1. Dôkaz o zhode s vyššie uvedenými normami môžu certifikovať výlučne skúšobne, ktoré spĺňajú európske normy série EN 45 000.

   2. Osobitnéprípady

      Ak je zjavné, že balenie je dostatočne bezpečné pre deti, pretože nemôžu získať prístup k jeho obsahu bez pomoci nástroja, test nie je potrebné uskutočniť.

      Vo všetkých ostatných prípadoch a ak existujú dostatočné dôvody na pochybnosti o bezpečnosti uzáveru pre deti, štátny orgán môže požiadať osobu zodpovednú za uvedenie výrobku na trh o preukázanie certifikátu skúšobne uvedenej v bode 3.1. uvádzajúcim buď:

      — že typ uzáveru je taký, že nie je potrebné overovať ISO a CEN normy uvedené vyššie,

        alebo

      — že uzáver bol testovaný a vyhovuje normám uvedeným vyššie.

ČASŤ B

Ustanovenia o hmatových výstražných prvkoch

Technické špecifikácie pre hmatové výstražné prvky musia spĺňať normu EN ISO 11683 (vydanie z roku 1997) vzťahujúcu sa na ‚Balenie — hmatové výstražné prvky — požiadavky'.